

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

E.A.P. DE GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA

**“EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DE L-
CISTEÍNA EN EL DILUTOR TES-TRIS-YEMA,
SOBRE LA CALIDAD ESPERMÁTICA POST-
DESCONGELAMIENTO EN ALPACA (*Vicugna
pacos*)”**

TESIS

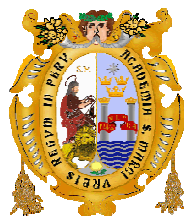
**Para optar el Título Profesional de
Bióloga Genetista Biotecnóloga**

AUTOR

Marilyn Reyna Suárez Pinedo

Lima – Perú

2014



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA

**EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DE L-CISTEÍNA EN EL
DILUTOR TES-TRIS-YEMA, SOBRE LA CALIDAD
ESPERMÁTICA POST-DESCONGELAMIENTO EN ALPACA
(*Vicugna pacos*)**

Tesis para optar al Título Profesional de

Bióloga Genetista Biotecnóloga

Bach. MARILYN REYNA SUÁREZ PINEDO

Asesora: Mg. MARTHA ESTHER VALDIVIA CUYA

Lima – Perú

2014

ACTA DE SUSTENTACIÓN

CONTRACARATULA

DEDICATORIA

A Dios por todo lo que tengo en esta vida.

A mis padres, Jubenal y Reyna; y
a mis hermanos, Rocio, Judith y Cesar
por su amor, enseñanzas, confianza y apoyo.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a mi familia, por darme la oportunidad, las condiciones y el apoyo necesario para completar este paso adicional. A mis sobrinos, Ximena, Kiara, César, Andrew y Sophia, por su alegría transmitida.

A mi asesora de tesis la Mg. Martha Esther Valdivia Cuya por sus conocimientos impartidos, paciencia, incentivo y principalmente por sus orientaciones profesionales y personales.

Al profesor Dr. Jaime Ruiz Béjar, Jefe del Laboratorio de Biotecnologías Reproductivas de la Universidad Nacional de Huancavelica por brindarme y promover las condiciones adecuadas para el desarrollo de esta investigación.

A Isela Mancisidor Solorzano por haber sido una excelente compañera de tesis y amiga, por haberme dado confianza, paciencia, apoyo, consejos; por estar en las buenas y en las malas en la realización de esta investigación y principalmente por su amistad.

A Natalia y Elizabeth por sus palabras de incentivo y amistad.

A Paulo, Indira, José, Duriel, Sugar, a quienes conocí en la UNH, por el intercambio de experiencias, sus consejos, ánimos y amistad.

A Rosmary, Pepé, Jonathan, Luis, Andree, Sheyla y a todos mis compañeros del Laboratorio de Fisiología de la Reproducción Animal (LFRA) de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, que convivieron conmigo y de alguna forma me ayudaron a la realización de este trabajo.

A la Mg. Nadia Canorio Pariona, Mg. Alejandro Florientini y Mg. Claudia Rodriguez por su gran ayuda, paciencia y por su disponibilidad de tiempo para aclarar mis dudas y por sus conocimientos transmitidos.

Son muchas las personas a las que me encantaría dar las gracias, por su amistad, consejos, apoyo, ánimo y compañía en los momentos más difíciles de mi vida. Sin importar en donde estén quiero darles las gracias por formar parte de mí, por todo lo que me han brindado y por todas sus bendiciones. Para ellos: Muchas gracias y que Dios los bendiga.

ÍNDICE GENERAL

ACTA DE SUSTENTACIÓN	III
CONTRACARATULA	III
DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTOS	II
ÍNDICE GENERAL	III
RESUMEN	VI
ABSTRACT	VII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	4
2.1 CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS	4
2.1.1 Especie en estudio: Alpaca (<i>Vicugna pacos</i>)	4
2.1.2 Población de ganado alpaquero	6
2.1.3 Situación económica de la alpaca en el Perú	6
2.2 FISIOLÓGIA REPRODUCTIVA DE LA ALPACA MACHO	8
2.2.1 Estacionalidad de la reproducción	8
2.2.2 Fertilidad	9
2.2.3 Características del semen	10
2.2.4 Anormalidades de los espermatozoides	10
2.3 CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES	13
2.3.1 Beneficios de la criopreservación	13
2.3.2 Daños causados durante el proceso de criopreservación	14
2.3.2.1 Estrés osmótico	14
2.3.2.2 Estrés mecánico	15
2.3.2.3 Estrés térmico	15
2.4 STRESS OXIDATIVO CAUSADO DURANTE LA CRIOPRESERVACIÓN	16
2.4.1.1 Generación de Especies Reactivas de Oxígeno (EROs)	17
2.4.1.2 Causas del daño espermático durante la criopreservación	18
2.4.1.3 Peroxidación de lípidos	18
2.5 ANTIOXIDANTES	18
2.5.1 Agentes antioxidantes enzimáticos	19
2.5.2 Agentes antioxidantes no enzimáticos	19

2.5.3	<i>Efecto de los antioxidantes sobre el estrés oxidativo y función espermática</i>	19
2.6	ANTIOXIDANTE L-CISTEÍNA	20
2.6.1	<i>Acción antioxidante de L-cisteína sobre espermatozoides congelados</i>	20
2.7	BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN EN ALPACA MACHO	25
2.7.1	<i>Criopreservación en espermatozoides de Alpaca</i>	26
2.8	PRUEBAS DE EVALUACIÓN ESPERMÁTICA	32
2.8.1	<i>Movilidad espermática</i>	32
2.8.2	<i>Integridad de membrana plasmática</i>	32
2.8.3	<i>Integridad de la membrana acrosomal</i>	33
2.8.4	<i>Integridad del ADN</i>	34
3.	HIPÓTESIS Y VARIABLES	35
3.1	HIPÓTESIS	35
3.1.1	<i>Hipótesis de investigación</i>	35
3.1.2	<i>Hipótesis nula:</i>	35
3.2	VARIABLES	35
4.	OBJETIVOS	36
4.1	OBJETIVO GENERAL	36
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
5.	MATERIALES Y MÉTODOS	37
5.1	MATERIALES	37
5.1.1	<i>Material biológico</i>	37
5.1.2	<i>Reactivos</i>	37
5.1.3	<i>Equipos e instrumentos</i>	38
5.1.4	<i>Material de plástico, metal y vidrio</i>	39
5.1.5	<i>Soluciones</i>	39
5.2	METODOLOGÍA	41
5.2.1	<i>Colección de las muestras</i>	41
5.2.2	<i>Procesamiento y evaluación de las muestras</i>	41
5.2.2.1	<i>Evaluación de la movilidad</i>	43
5.2.2.2	<i>Medición de la concentración</i>	43
5.2.2.3	<i>Evaluación de la vitalidad</i>	44
5.2.2.4	<i>Evaluación de la Integridad funcional de membrana plasmática (test HOST)</i>	45
5.2.2.5	<i>Evaluación de la integridad acrosomal</i>	46

5.2.3	<i>Preparación de Solución Stock L-cisteína</i>	47
5.2.4	<i>Protocolo de criopreservación</i>	50
5.2.5	<i>Descongelación de las muestras</i>	50
5.2.6	<i>Análisis de datos</i>	55
6.	RESULTADOS	56
6.1	EFFECTO DEL ANTIOXIDANTE L-CYSTEINA SOBRE LA CALIDAD ESPERMÁTICA POST DESCONGELACIÓN	56
6.1.1	<i>Movilidad espermática post descongelación</i>	56
6.1.2	<i>Vitalidad espermática post descongelación</i>	57
6.1.3	<i>Integridad de la membrana plasmática espermática post descongelación</i> 59	
6.1.4	<i>Integridad de la membrana acrosomal espermática post descongelación</i>	60
7.	DISCUSIÓN	62
8.	CONCLUSIONES	68
9.	RECOMENDACIONES	69
10.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
11.	ANEXOS	83
11.1	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	83
11.1.1	<i>Prueba de Normalidad</i>	83
11.1.2	<i>Evaluación de las muestras espermáticas pre congelación y post descongelación</i>	84
11.1.3	<i>Evaluación de las muestras espermática post descongelación, según la concentración de L-cisteína empleado</i>	85
11.1.3.1	<i>Movilidad Post descongelación</i>	85
11.1.3.2	<i>Vitalidad post descongelación</i>	87
11.1.3.3	<i>Integridad de membrana plasmática post descongelación</i>	88
11.1.3.4	<i>Integridad de membrana acrosomal post descongelación</i>	89
11.2	FOTOS.....	90

RESUMEN

El estudio evaluó el efecto de la suplementación de L- cisteína al dilutor tes-tris-yema sobre la calidad post descongelación de espermatozoides de *Vicugna pacos* “alpaca”. Con este propósito, dieciséis muestras de espermatozoides epididimarios fueron colectados de alpacas en el Camal Municipal de Huancavelica - Perú, durante un período de cuatro semanas. Cada muestra se diluyó en el dilutor Tes-Tris-Yema de huevo y se dividió en cuatro alícuotas, conteniendo diferentes concentraciones del antioxidante: L-cisteína 0 mM (tratamiento control), L- cisteína 2.5 mM (tratamiento 1), L-cisteína 5 mM (tratamiento 2) y L-cisteína 10 mM (tratamiento 3). Luego las suspensiones espermáticas fueron cargadas en pajillas (0,25 mL) y criopreservadas mediante la metodología de congelamiento lento programado en un congelador de velocidad controlada, finalmente las pajillas se almacenaron en nitrógeno líquido. La descongelación se realizó a 50 ° C durante 7 seg, la movilidad, vitalidad, integridad de membrana plasmática y acrosómica de los espermatozoides; fueron evaluados post descongelación. Los resultados de este estudio mostraron que la suplementación de 2.5 mM de L- cisteína en el medio dilutor de criopreservación mejora significativamente la movilidad y la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides después de la descongelación, en comparación con los demás tratamientos y el grupo control ($p < 0.05$). Se concluye que la adición de L- cisteína a bajas concentraciones (2.5 mM) en el dilutor proporciona un efecto crioprotector sobre los parámetros espermáticos post descongelación en alpaca.

Con formato: Inglés (Estados Unidos)

ABSTRACT

The present study evaluated the effect of L-cysteine supplementation to tes-tris-yolk extender on the post-thaw quality of *Vicugna pacos* "alpaca" sperm. For this purpose, sixteen epididymal sperm samples were collected from male alpaca in the Camal Municipal of Huancavelica - Perú, in a period of four weeks (three replicates). Each sample was diluted in tes-tris-yolk extender and divided into four aliquots of different concentrations of antioxidant: 0 mM L-cysteine (Control), 2.5 mM L-cysteine (Treatment 1), 5 mM L-cysteine (Treatment 2) and 10 mM L-cysteine (Treatment 3). Then the sperm suspensions were loaded in straws (0.25 mL) and were cryopreserved using the slow freezing methodology in a controlled-rate freezer. Finally the straws were stored in the liquid nitrogen. Thawing was performed, at 50°C for 7 s and the sperm motility, viability, plasma membrane and acrosomal integrity were assessed post-thaw. The results of this search show that the supplementation of L-cysteine 2.5 mM to tes-tris-yolk extender significantly improved the motility and plasma membrane integrity compared to the other treatments and the control group ($P < 0.05$). It is concluded that the addition of L-cysteine (2.5 mM) in the extender gave a cryoprotective effect on the alpaca sperm parameters post-thaw.

1. INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años ha existido un interés creciente por las técnicas de reproducción asistida, entre ellas la criopreservación de semen de mamíferos, la cual es una herramienta valiosa para la preservación de la carga genética de machos sementales genéticamente superiores. Esto ha facilitado el uso generalizado de la inseminación artificial (IA) en el ganado vacuno, equino y ovino; permitiendo la difusión masiva de material genético seleccionado.

En Perú la alpaca (*Vicugna pacos*) constituye la especie ganadera más importante dentro de los camélidos sudamericanos en cuanto se refiere a la producción de fibra (Wuliji *et al.*, 2000; León Velarde y Guerrero, 2001), esto ha convertido a la alpaca en uno de los recursos económicos más importante del poblador alto-andino peruano, por la calidad de su fibra y carne, además de los subproductos como las pieles y cueros. Perú es el país que presenta una mayor densidad poblacional de esta especie en comparación a los demás países Altoandinos; por consiguiente es el primer productor mundial de fibra de alpaca y en el año 2003 se registró una producción de 6440TM por un valor encima de los 82 millones de dólares (De los Ríos, 2006). Sin embargo esta especie presenta serios problemas reproductivos que la aquejan y representan un gran riesgo para la misma; por otro lado esta deficiencia en la calidad reproductiva de las alpacas afecta considerablemente a muchos pobladores Altoandinos que basan su economía en la crianza y reproducción de esta especie generándoles grandes pérdidas económicas. Aunque existe un considerable interés en la aplicación de la tecnología de IA en alpacas, este se ve limitado ya que hasta el momento la técnica de criopreservación de espermatozoides no ha sido bien desarrollada.

El desarrollo de tecnologías de criopreservación espermática en alpacas se basa en información derivada de los logros alcanzados en otras especies. Sin embargo, las variaciones en la fisiología y bioquímica de los espermatozoides, la anatomía y fisiología del transporte de espermatozoides en el tracto reproductor femenino, supone que la simple extrapolación del éxito de la tecnología de congelación de espermatozoides de una especie a otra no es posible (Holt, 2000). Hay muchos parámetros que afectan la eficiencia de la criopreservación de semen. Estos incluyen el dilutor (buffer, la fuente de energía y otros aditivos), crioprotector (tipo y concentración), el tiempo de exposición de los espermatozoides a los crioprotectores, la temperatura de exposición al crioprotector, el llenado de pajillas y la velocidad de congelación y descongelación. Evidentemente, el poco conocimiento de la fisiología, el bajo volumen, la alta viscosidad, la heterogeneidad y pobre calidad seminal hacen un

problema el manejo, dilución y evaluación de la muestra; conllevando al bajo éxito de congelación y descongelación en muestras de semen de alpaca. También se debe tener en cuenta que la fertilidad de los machos alpaca disminuye con el aumento del número de apareamientos consecutivos (Bravo *et al.*, 1997b).

Previos estudios en alpaca han escogido investigar las bases del proceso de congelación y descongelación con muestras de espermatozoides del epidídimo, los cuales muestran tolerancia a congelación y descongelación (Morton *et al.*; 2007, Canorio, 2009).

Se ha reportado el efecto perjudicial de los procesos de congelación y descongelación sobre los espermatozoides, el shock térmico, estrés osmótico y el estrés oxidativo de las especies reactivas del oxígeno (EROs). Dicha producción de EROs alteran la movilidad post-descongelación, viabilidad, actividad enzimática intracelular, fertilidad y funciones de los espermatozoides. Las células espermáticas contienen altas concentraciones de ácidos grasos poli insaturados, por lo tanto, son células altamente susceptibles a la peroxidación lipídica por efecto de las EROs, lo que conduce a la pérdida de movilidad, integridad de membrana, capacidad de fertilización en procesos de IA, produce cambios metabólicos de los espermatozoides, daño a la integridad del acrosoma y la integridad del ADN.

Durante los últimos años, se han realizado muchas investigaciones sobre la suplementación del medio dilutor con antioxidantes durante la criopreservación de espermatozoides en distintas especies (Askari *et al.*, 1994; Bilodeau *et al.*, 2001; Satorre *et al.*, 2007), en un intento de minimizar el efecto perjudicial de las EROs. La cisteína es un antioxidante no enzimático, que estimula la síntesis de glutatión, mejorando así el mantenimiento de los niveles de glutatión reducido en el interior de la célula y disminuyendo las EROs.

El uso de cisteína como antioxidantes en el medio dilutor en la criopreservación de espermatozoides de cerdo, toro, humano, oveja y cabra ha demostrado prevenir la pérdida de movilidad, viabilidad y de integridad de membrana durante la criopreservación (Bilodeau *et al.*, 2001; Funahashi y Sano, 2005; Kaeoket *et al.*, 2010).

Actualmente no existen reportes sobre el uso de L-cisteína como suplemento antioxidante en el medio dilutor de criopreservación en alpacas. Por lo antes mencionado y en base a estudios previos, existe la necesidad de optimizar las metodologías de criopreservación ya existentes. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es evaluar el efecto potencial de la suplementación de L-cisteína al dilutor Tes-

Tris-Yema a diferentes concentraciones (2.5, 5 y 10 mM) como un protector sobre los parámetros fisiológicos post-descongelamiento de movilidad, vitalidad, integridad de membrana plasmática y acrosomal en espermatozoides epididimarios de alpacas raza Huacaya; y así, encontrar la concentración más adecuada de L-cisteína. Para dicho fin se empleó espermatozoides epididimarios como modelo, para establecer y perfeccionar los métodos de criopreservación en futuros estudios realizados con semen de alpaca; de esta manera maximizar el número de espermatozoides vivos con capacidad funcional post-descongelación y buscar optimizar las tasas de fertilidad. Con el objetivo a largo plazo de crear un banco de semen a partir de machos sementales reproductores en alpaca.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Camélidos sudamericanos

Bajo la denominación de Camélidos Sudamericanos se engloba a dos especies silvestres Vicuña y Guanaco; y a dos especies domésticas Llama y Alpaca. Las cuales son mamíferos herbívoros pertenecientes al Orden *Artiodactyla*, Familia *Camelidae*.

2.1.1 Especie en estudio: Alpaca (*Vicugna pacos*)

La alpaca (del quechua *allpaqa*, *paqu*) es un mamífero doméstico artiodáctilo de la familia *Camelidae*, según estudios usando ADN mitocondrial (Wheeler *et al.*, 2001) la alpaca (*Vicugna pacos*) proviene de su antecesor la vicuña (*Vicugna vicugna*).

La actual distribución geográfica de la alpaca se extiende desde Ecuador (reciente introducción) hasta el Lago Poopo en Bolivia, con un menor número de animales en el norte de Chile y Argentina. La alpaca es considerablemente más pequeña que la llama, raramente es utilizada como animal de carga, siendo más bien criada para la producción de fibra y carne, el uso de su fibra es el principal ingreso de la cría de alpaca y es un producto bien valorizado.

Existen dos variedades (razas) domesticadas:

- **La Huacaya:** se caracteriza por tener un vellón parecido al del ovino Corredale, compuesto por fibras finas de unas 24 micras perpendiculares al cuerpo de corta longitud y presencia de ondulaciones; y son la mayoría.
- **La Suri:** se caracteriza por tener el vellón como el del ovino de Lincoln con fibras más finas que la huacaya, agrupadas en mechadas espiriladas o rizadas que crecen hasta 40cm paralelas al cuerpo. La raza suri vive casi exclusivamente en Puno y su población está declinando, por lo que corremos el riesgo de perder su fina y sedosa fibra.

En Perú, la población total de alpacas de la raza Huacaya representa el 85% (blanco 95% y color 5%), y la raza Suri sólo un 15% cuyo efectivo poblacional está disminuyendo (Brenes *et al.*, 2001). El color de la fibra es variado, aunque más uniforme que el de la Llama, del blanco al negro, presentando tonalidades del marrón claro, oscuro, así como el gris plata, todos ellos como colores naturales. Por otro lado, la carne de alpaca tiene demanda local (Pumayalla y Leyva, 1988), aunque es la fibra el producto de inigualable calidad textil.



Figura N° 1: Razas de alpaca: Huacaya y Suri

Fuente: Aguilar (2012).

Tabla N° 1: Características generales de la alpaca

Ítem	Características	Alpaca
1	Genero	<i>Vicugna pacos</i>
2	Razas	Huacay Suri
3	Distribución	Perú, Bolivia, Chile, Argentina, USA, UK, Australia
4	Población	3.5 millón en América del sur
5	Peso vivo	55 – 80 kg.
6	Altura al hombro	94 - 104
7	Descripción	Un solo color o de varios colores, de blanco al negro y gris
8	Productos	Fibra, carne y piel
9	Diámetro de fibra	12 – 40 um.
10	Edad del primer cruzamiento	Hembra: 12 meses Macho: 24 -36 meses
11	Tiempo de copula	20 – 25 min.
12	Duración de gestación	11 meses
	Peso de ovario	1 – 4 g.
	Peso del testículo	17.2 g.

Fuente: adaptado de Vaughan (2001).

2.1.2 Población de ganado alpaquero

El Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI) reportó según el IV Censo Nacional Agropecuario (2012), que el Perú posee la mayor población mundial de alpacas con más de 3 millones de ejemplares (87 % de la población mundial). La población de alpacas es de 3 685 5 superando en 50.2% a la encontrada en el censo agropecuario de 1994. La raza Huacaya concentra el 80.4% de la distribución, seguida de la raza Suri con 12.2% y Cruzados (mestizos) con 7.3%.

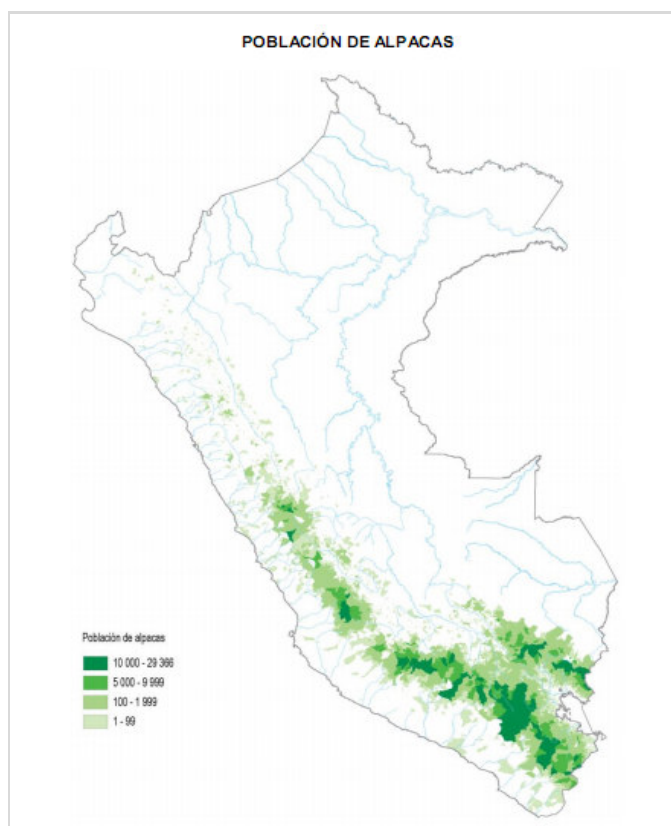


Figura N° 2: Población de alpacas en el Perú, 2012

Fuente: Instituto Nacional de Estadística e Informática - IV Censo Nacional Agropecuario (2012).

2.1.3 Situación económica de la alpaca en el Perú

La crianza de alpacas es una de las actividades de mayor importancia e impacto en el desarrollo socio económico de la población alto andina de nuestro país, la importancia económica radica en la finura de la fibra y en el aprovechamiento de forma integral de esta especie (fibra, cuero y carne) y su transformación, genera una producción valorizada de US\$ 50 millones anuales, sin embargo, las deficiencias en los esquemas

de crianza tradicional, como la crianza conjunta de alpacas y llamas, con los consiguientes cruzamientos no programados, han contribuido a disminuir la calidad genética de los animales, originando una pérdida en la cantidad y calidad de fibra, reportándose que el 45 % de la producción de fibra tiene una finura de 26.0 micras y el 46 % una de 33.0 micras y solo un 8 % presenta una fibra del 22.0 micras (Freyre, 2006).

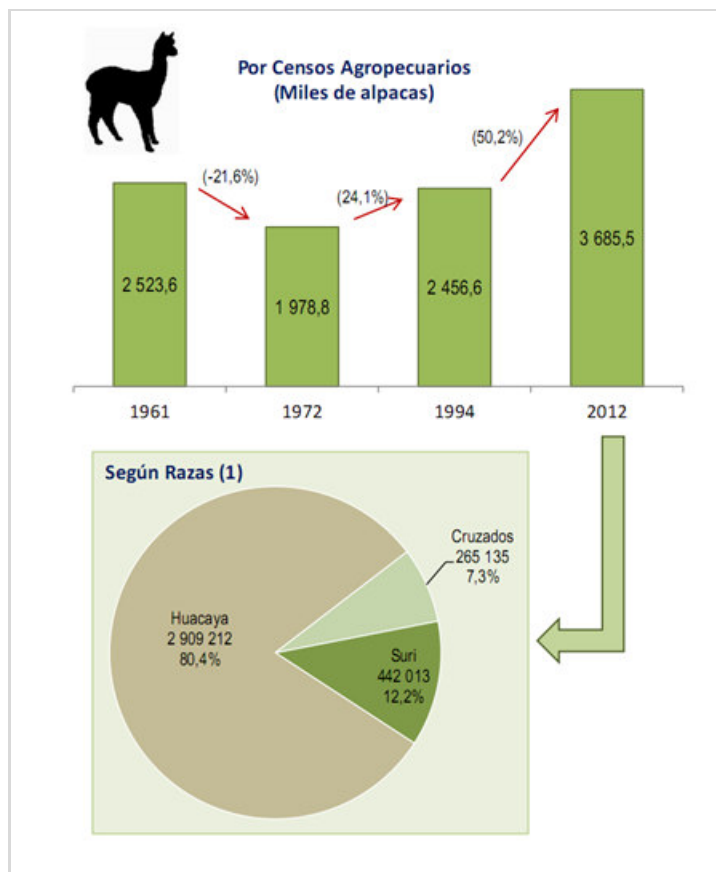


Figura N° 3: Alpaca, especie en estudio

Fuente: Instituto Nacional de Estadística e Informática - IV Censo Nacional Agropecuario (2012).

Sin embargo por influencia de la demanda del mercado se observa el blanqueo de los rebaños, es decir la desaparición de los animales de color y una mayor saca de las llamas para incrementar las alpacas, en estas condiciones existe el peligro de la desaparición de la variabilidad genética de los camélidos. Ante el blanqueo inminente de los rebaños de alpacas que se encuentra en poder de las comunidades campesinas, pequeños, medianos y grandes criadores se hace necesario contar con

Bancos de Germoplasma de alpacas de color en sus dos razas por las siguientes razones:

- Permite recuperar la variabilidad de las alpacas de color que, por influencia del mercado externo, van camino a la desaparición.
- Disponer de una variabilidad de colores que presentan las alpacas de acuerdo a las tonalidades identificadas por la industria.
- Recuperar, animales de colores raros o muy escasos en nuestro país mediante la biotecnología reproductiva: Criopreservación de semen, inseminación artificial, transferencia y criopreservación embriones.

En camélidos, la posibilidad de mejora genética de los rebaños de productores mediante la prueba de progenie, con la formación de núcleos de reproductores, requiere años de trabajo y está limitada, entre otros factores, por el largo intervalo generacional y la capacidad fisiológica de una hembra que solo puede tener hasta 4 crías, durante toda su vida reproductiva (Novoa *et al.*, 1999).

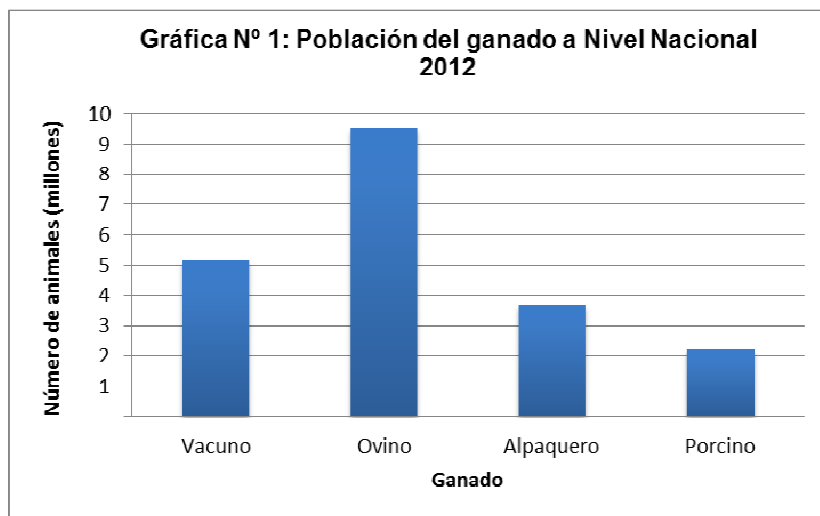


Figura N° 4: Población del ganado a Nivel Nacional, 2012

Fuente: Instituto Nacional de Estadística e Informática - IV Censo Nacional Agropecuario (2012).

2.2 Fisiología reproductiva de la alpaca macho

2.2.1 Estacionalidad de la reproducción

Generalmente en el Nuevo Mundo los camélidos sudamericanos son considerados menos estacionales en comparación con los del Viejo Mundo, aunque hay una estación reproductiva definida en América del Sur que se extiende de noviembre a

mayo, primavera – otoño (Bravo, 2002). En los EE.UU. y Australia, sin embargo, no se consideran reproductores estacionales y son capaces de aparearse y dar a luz durante todo el año (Smith *et al.*, 1994). En Perú, febrero y marzo son los meses pico de cría de alpacas, tras las lluvias de verano y un mayor crecimiento del pasto (Garnica *et al.*, 1993; Raymundo *et al.*, 2000).

Tabla N° 2: Concentración de testosterona plasmática de la alpaca durante un año

Ítem	Estación	Testosterona en plasma (pg/mL)
1	Verano	1142.5 ± 108.3
2	Otoño	992.5 ± 388
3	Invierno	877.5 ± 91.3
4	Primavera	2445.0 ± 694.8

Fuente: Bravo (2002).

2.2.2 Fertilidad

En condiciones de monta natural, la preñez y las posteriores tasas de parto siguiendo un solo apareamiento han sido reportadas como bajas y menos eficientes que otras especies de granja (Sumar *et al.*, 1983). Para minimizar el número de apareamientos por concepción se ha recomendado seleccionar machos con testículos grandes, con el supuesto que existe una relación directa entre el tamaño de los testículos y la producción de espermatozoides como ocurre en los otros animales domésticos (Smith, 1999; Brown, 2000; Galloway, 2000). La longitud media del testículo (el promedio de longitud de los testículos izquierdo y derecho) se correlaciona con el peso testicular (Galloway, 2000) y puede ser utilizado como un simple medio de evaluación de tamaño testicular en alpacas. La longitud media del testículo puede ser utilizado para estimar la probabilidad de producción de espermatozoides en alpacas (Ver Tabla N° 3)

Tabla N° 3: Desarrollo de la función testicular en alpacas según tamaño testicular

El promedio de longitud testicular(cm)	La proporción de machos (%)	% Tejido testicular que contiene espermátidas alargadas
< 3	100	0
	68	<10
3 - 4	31	30 - 60
	36	<10
>4	31	10 - 60
	31	>60

Fuente: Galloway (2000).

2.2.3 Características del semen

El eyaculado de los camélidos se caracteriza por un bajo volumen y alta viscosidad, bajo número de espermatozoides y los parámetros son muy variables entre los individuos, y entre eyaculados recogidos en el mismo macho. Potencialmente, esto puede dar lugar a problemas en la obtención de los eyaculados de calidad aceptable para la conservación de espermatozoides e inseminación artificial (Raymundo *et al.*, 2000). En la alpaca, el semen se compone de 11,5% de espermatozoides y 88,5% de líquido seminal (Garnica *et al.*, 1993). El volumen de semen, la concentración de espermatozoides, el porcentaje de espermatozoides vivos, el porcentaje de espermatozoides de morfología normal y la duración de la copulación se han observado que varían entre los machos alpaca, sin embargo, la oscilación y el pH no difiere entre los machos (Bravo *et al.*, 1997a). El volumen de cada eyaculado en alpacas es en promedio 1-2ml y oscila entre menos de 1ml hasta aproximadamente 7ml (von Kubicek, 1974). Los volúmenes son generalmente más bajos cuando el semen es recogido por electroeyaculación que con el uso de una vagina artificial (Tibary y Memon, 1999). El semen se describe generalmente como lechoso o cremoso de color blanco (Garnica *et al.*, 1993; Bravo *et al.*, 1997b) en función de la concentración de espermatozoides (Tibary y Memon, 1999).

2.2.4 Anormalidades de los espermatozoides

En camélidos sudamericanos, los altos niveles de anomalías de la cabeza incluyen pequeño, grande, piriforme, estrecho y dobles cabezas, además de la pérdida de la cola (Bravo *et al.*, 1997a, b; Flores *et al.*, 2002). Las anomalías de la pieza media del espermatozoide incluyen media pieza gruesa, gotas proximales y mitocondrias irregulares o ausentes. Anomalías de la cola incluyen cola en espiral, dobladas y dobles colas.

Tabla N° 4: Parámetros de semen de alpaca

Referencia	Método de colección	Tiempo de copulación	Color	Características del eyaculado			Características espermáticas			
				Consistencia	Volumen	pH	Concentración (10 ⁶ ml ⁻¹)	Movilidad (%)	Vitalidad (%)	Morfología normal (%)
Mogrovejo 1952	Preservativo	-	Lechoso	Viscoso	1.9	8.3	33	Bajo	-	41
von Kubicek 1974	Fistula uretral	-	-	-	6.6	7.5	0.6	0-85	-	-
Garnica <i>et al.</i> 1993	Maniquí VA	-	Lechoso cremoso	Viscoso	1.7 ± 0.2	-	-	50	-	-
Bravo <i>et al.</i> 1996	EEJ / Maniquí VA	-	Lechoso	Viscoso	1.4 1.7	7.6 7.5-7.8	0.032 0.150	Promedio Oscilatorio	76	76
Bravo <i>et al.</i> 1997a	VA	17.9 ± 0.7	-	Viscoso	1.6 ± 0.7	7.8 ± 0.03	72.4 ± 7.9	78.8 ± 2.3	75.5 ± 2.2	75.5 ± 0.9
Bravo <i>et al.</i> 1997b	VA	21.8	Blanco lechoso	Viscoso	1.9 ± 0.4	7.2	2.9 ± 0.15	85 ± 5.2	69.6 ± 3.7	75.9 ± 2.1
Fowler <i>et al.</i> 1998	-	-	Blanco cremoso	Gelatinoso	1.9 ± 0.4	7.2 – 7.8	147.5 ± 8	85 ± 5.2	69.6 ± 3.7	75.9 ± 2.1
Bravo <i>et al.</i> 2000	Maniquí VA	-	-	Viscoso	-	-	-	68.2	74.9	-
Raymundo <i>et al.</i> 2000	Maniquí VA	28.4 ± 8.4	-	Viscoso	2.6 ± 1.8	-	0.062 ± 0.037	49.7 ± 22.6	-	-
Bravo 2002	Maniquí VA	-	Lechoso translucido	Semi viscoso	-	-	30 - 170	40 - 80	45 - 90	-
Flores <i>et al.</i> 2002	Maniquí VA	12.3 ± 7.2	Blanco opalescente	-	1.8 ± 0.8	-	600	Alto	-	-

Davalos <i>et al.</i> 2002	Maniquí VA hembra &	16.8 ± 0.7			1.73 ± 0.10		0.575 ± 0.083	68.9 ± 4.9	72.1 ± 1.9	86.0
	Maniquí VA no hembra	15.9 ± 0.6	-	-	1.03 ± 0.04	-	0.328 ± 0.043	34.2 ± 5.3	34.3 ± 4.2	85.0

Fuente: Adaptado de Vaughan *et al.* (2003). Abreviatura VA: vagina artificial; EEJ: electroeyaculación.

Tabla N° 5: Anormalidades de espermatozoides de alpaca

Referencia	% Cabezas anormales (rango)	% Cola corta (rango)	% Gotas citoplasmáticas (rango)	% Acrosoma anormal (rango)	% Pieza media anormal (rango)	% Cola anormal (rango)
Bravo <i>et al.</i> 1997a	6.7 ± 1.4 (2.6 - 12.6)	-	3.8 ± 0.8 (1.3 - 7.3)	-	-	12.3 ± 0.8 (9.4 - 15.2)
Bravo <i>et al.</i> 1997b	3.8 ± 0.8 (1.3 - 7.3)	-	3.6	-	-	14.5
Davalos <i>et al.</i> 2002	-	-	-	-	-	15
Flores <i>et al.</i> 2002	13.2	14.8 ± 15.2 (3.0 - 62.5)	9.3	-	14.4	11.8

Fuente: Adaptado de Morton *et al.* (2008).

2.3 Criopreservación de espermatozoides

La criopreservación de espermatozoides en nitrógeno líquido tiene como objetivo fundamental prolongar la viabilidad de los gametos masculinos de forma indefinida, ya que a temperatura ambiente o de refrigeración los espermatozoides degeneran con cierta rapidez, debido principalmente al agotamiento de las reservas energéticas. La inseminación artificial con espermatozoides criopreservados ha demostrado ser la tecnología reproductiva que más ha contribuido a acelerar el progreso genético de las diferentes especies ganaderas, especialmente del ganado vacuno y porcino; sin embargo, el éxito de esta tecnología depende de que los espermatozoides utilizados mantengan su poder fecundante tras su descongelación. Para conseguir dicho objetivo, todo protocolo de congelación espermática debe ser controlado rigurosamente en cada etapa del proceso de criopreservación (Figura N° 5), y de forma especial aquellos que influyen más directamente sobre la estructura y función de las membranas espermáticas, y sobre el metabolismo celular (Hammerstedt *et al.*, 1990a).



Figura N° 5: Pasos generales de protocolo de criopreservación de espermatozoides

2.3.1 Beneficios de la criopreservación

- Permite el intercambio de material genético de última generación a larga distancia y durante un periodo muy largo (años), delimitando con precisión el efecto del semen congelados en cuanto al número de crías nacidas. Especialmente aplicable a las líneas puras.
- Creación de bancos genéticos. De interés evidente en el caso de la conservación de razas en peligro de extinción y de grandes posibilidades para la conservación de líneas o extirpes de especial interés.
- Estos bancos de genes también pueden ser importantes a nivel comercial por ejemplo para asegurar la conservación de líneas genéticas valiosas ante posibles

situaciones desfavorables (epizootía, incapacidad para recogida, infertilidad / subfertilidad por altas cambios climáticos, etc.)

- A nivel práctico permite introducir material genético de alto valor sin los riesgos derivados de la introducción de nuevos animales en la exportación y libres de enfermedades.
- Los centros de inseminación artificial donde se produce el semen congelado están debidamente autorizados y cumplen con las normas sanitarias recomendadas y actualizadas para la exportación. Los centros tienen que ser libres de enfermedades.

2.3.2 Daños causados durante el proceso de criopreservación

Los daños que sufren las células espermáticas cuando son sometidas al proceso de congelación son mostrados en la Tabla N° 6:

Tabla N° 6: Tipos de estrés causados durante la criopreservación

Estres	Causado por
Estrés osmótico	Adición/eliminación del crioprotector y congelación del agua extracelular
Estrés mecánico	Formación de hielo intra/extra celular
Estrés térmico	Descenso de temperatura

2.3.2.1 Estrés osmótico

Durante el proceso de congelación las células sufren cambios de volumen durante la adición y eliminación de los crioprotectores permeables, así como durante la congelación y descongelación del agua extracelular. Los crioprotectores permeables son capaces de atravesar la membrana plasmática, pero su paso es más lento que el del agua, debido a su peso molecular. Esta respuesta osmótica puede ser potencialmente letal si la célula alcanza sus límites de tolerancia osmótica.

Durante la adición del crioprotector las células disminuyen de tamaño transitoriamente al perder el agua intracelular debido al ambiente hiperosmótico que se crea. Poco a poco, las células recuperan su tamaño original al equilibrarse las condiciones osmóticas dentro y fuera de la célula. Además, las células son sometidas a condiciones de estrés osmótico durante la congelación y descongelación del agua extracelular.

2.3.2.2 Estrés mecánico

Cuando los espermatozoides son enfriados por debajo del punto de congelación de la solución en la que se encuentran comienzan a formarse cristales de hielo en el medio extracelular. Debido al diferencial de la presión osmótica, el agua intracelular comienza a salir de la célula y a congelarse. Este fenómeno está influenciado por la permeabilidad de la membrana plasmática, la concentración del crioprotector y, sobre todo, por la velocidad de congelación y descongelación (Blanch, 1997)

Con una velocidad de congelación demasiado lenta el espermatozoide pierde toda el agua intracelular, de manera que no se forman cristales de hielo intracelulares. Sin embargo, los espermatozoides son sometidos a condiciones hiperosmóticas.

Por el contrario cuando la velocidad de congelación es demasiado rápida el agua intracelular no llega a salir del espermatozoide y se forma hielo intracelular (Johnson, *et al.*, 2000).

2.3.2.3 Estrés térmico

Durante el enfriamiento hasta 5°C la membrana plasmática sufre una reorganización de sus componentes (Hammerstedt *et al.*, 1990b). La membrana consta de una bicapa lipídica compuesta por diferentes tipos de fosfolípidos, proteínas integrales y colesterol. Cada una de las especies de fosfolípidos presenta una temperatura de transición de fase diferente. Cuando la membrana es sometida a un descenso de temperatura, se produce un cambio de fase de los fosfolípidos de fase líquida-cristalina a fase de gel y las cadenas de ácidos grasos que los componen se convierten en rígidas y paralelas. Se forman dominios de gel a medida que las diferentes familias de fosfolípidos llegan a su temperatura de transición de fase (mientras los fosfolípidos de otras familias siguen en fase líquida), de manera que se rompen las asociaciones normales de los fosfolípidos (entre ellos y con las proteínas de membrana), y el resultado final es una mayor rigidez de membrana (Johnson *et al.*, 2000). Cuando la membrana es devuelta a la temperatura inicial, los fosfolípidos vuelven al estado líquido, pero ni éstos ni las proteínas vuelven a su localización inicial, produciendo una alteración en la función de la membrana plasmática.

La cantidad de colesterol presente en la membrana influye en el comportamiento termotrópico de la misma y sus componentes (Johnson *et al.*, 2000), ya que el colesterol interactúa con las cadenas de ácidos grasos de los fosfolípidos (Watson, 1990), inhibiendo la cristalización de los hidrocarburos a bajas temperaturas. Con altos

niveles de colesterol en membrana se reduce o incluso se elimina la transición de fase de los fosfolípidos (Pursel y Johnson, 1987).

2.4 Stress oxidativo causado durante la criopreservación

El término "estrés oxidativo" se refiere a un desequilibrio entre la producción o acumulación excesiva de especies reactivas del oxígeno (EROs) y un mecanismo antioxidante afectado (Sikka, 2001; Agarwal *et al.*, 2003). Las células vivas almacenadas en condiciones aeróbicas, como sucede en los procesos de enfriamiento, congelación y descongelación, requieren oxígeno (O₂) para mantener su metabolismo normal (Agarwal *et al.*, 2003). Excesivos metabolitos de oxígeno tales como las EROs, pueden causar daño celular o apoptosis (de Lamirande y Gagnon, 1995). Las EROs son radicales libres, cada uno con un electrón no apareado, lo cual es una situación sumamente inestable. El electrón no apareado requiere establecer un vínculo con otro electrón para convertirse en estable. Por lo tanto, los radicales libres siempre atacan otras moléculas, capturando electrones estabilizan sus electrones no apareados (Nogushi y Niki, 1999).

Los más importantes EROs son el anión superóxido (O²⁻), radical hidroxilo (OH[•]), radical peróxido (ROO[•]) y también peróxido de hidrógeno (H₂O₂), que es el producto final de la reactividad de las ERO y es considerado como el más tóxico de los oxidantes (Halliwell, 1997; Nogushi y Niki, 1999; Silva, 2006).

El efecto adverso de ERO en los espermatozoides de mamíferos y la reproducción se informó por primera vez por McLeod (1943). Desde entonces, varios estudios han demostrado que los ROS están implicados en la infertilidad masculina (Aitken y Krausz, 2001; Sikka, 2001; Agarwal *et al.*, 2003).

Se ha demostrado que los radicales libres de oxígeno, como O²⁻ son producidos durante el proceso congelación-descongelación de espermatozoides humanos, bovinos y caninos (Mazzilli *et al.*, 1995; Tselkas *et al.*, 2000; Chatterjee y Gagnon, 2001; Michael *et al.*, 2007). Por otra parte, el ciclo de congelación y descongelación ha sido descrito como responsable de una disminución en el nivel de antioxidantes como el glutatión reducido (GSH) y la superóxido dismutasa (SOD) en espermatozoides humanos y bovinos (Alvarez y Storey, 1992; Bilodeau *et al.*, 2000). Esta disminución de antioxidantes permitiría que ERO causen daño a los espermatozoides durante el proceso de criopreservación.

Los espermatozoides son muy sensibles al estrés oxidativo debido a la gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados en la membrana plasmática (AGPMP). Estos ácidos

grasos son esenciales para el mantenimiento funcional de las células germinales masculinas (Henkel, 2005).

Durante la criopreservación disminuye dramáticamente los (AGPMP) debido a la peroxidación lipídica, esto se inicia cuando el espermatozoide es atacado por las EROs (de Lamirande y Gagnon, 1995; Sikka *et al.*, 1995). En mamíferos, la mayor fuente de formación de estas EROs incluyen la incubación aeróbica, la contaminación por los leucocitos, espermatozoides muertos o anormales y el exceso de residuos citoplasmática de espermatozoides conllevan a la formación de especies reactivas de oxígeno (EROs) que causan efectos nocivos en las membranas de los espermatozoides, disminución de la movilidad y, finalmente, caída del potencial de fertilidad (Álvarez *et al.*, 1987; Aitken *et al.*, 2004).

2.4.1.1 Generación de Especies Reactivas de Oxígeno (EROs)

Los espermatozoides por sí mismos pueden producir EROs a través de dos vías: el sistema NADPH oxidasa (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) en la membrana de los espermatozoides y la vía óxido-reductasa dependiente de NADPH en las mitocondrias espermáticas (Gavella y Lipovac, 1992; Agarwal *et al.*, 2003.). Las mitocondrias espermáticas, localizadas en la matriz mitocondrial más que el espacio intermembranoso, son la mayor fuente de generación de EROs (Agarwal *et al.*, 2003; Koppers *et al.*, 2008). En general, las EROs deben ser continuamente inactivados, de modo que sólo una cantidad mínima de ellos están presentes para mantener las funciones normales de la célula (Agarwal *et al.*, 2003). Los bajos niveles de EROs son, por ejemplo, necesario para la capacitación espermática y la reacción acrosómica (de Lamirande y Gagnon, 1993; de Lamirande y O'flaherty, 2008; Roy y Atreja, 2007).

Una acumulación excesiva de EROs tales como O_2^- o H_2O_2 puede causar daño en la membrana plasmática de espermatozoides de caballo (Baumber *et al.*, 2000), toro (Chatterjee y Gagnon, 2001), y humano; y daño en el ADN espermático tanto en el genoma mitocondrial y nuclear (Aitken y Krausz, 2001). La membrana mitocondrial interna y externa puede ser desorganizada por un alto nivel de EROs, conllevando a la activación de la vía caspasa, una serie de proteasas de cisteína citosólicas que desempeñan un papel en la inducción de la apoptosis (Agarwal *et al.*, 2003). Esto se confirmó por un estudio de Lozano *et al.* (2009) quien demostró que el H_2O_2 causa apoptosis en espermatozoides humanos mediante la activación de la caspasa-3.

Además, se ha demostrado que los radicales libres de oxígeno, tales como O_2^- son producidos durante el proceso de congelación-descongelación en espermatozoides en humanos, bovinos y caninos (Mazzilli *et al.*, 1995; Tselkaset *et al.*, 2000; Chatterjee y

Gagnon, 2001; Michael *et al.*, 2007). Por otra parte, el ciclo de congelación y descongelación se ha reportado como responsable de la disminución de los niveles de antioxidantes tales como glutatión (GSH) o superóxido dismutasa (SOD) en los espermatozoides de humanos y bovinos (Alvarez y Storey, 1992; Bilodeau *et al.*, 2000). Esta disminución de antioxidantes permitiría que las EROs causen daño a los espermatozoides durante el proceso de congelación.

2.4.1.2 Causas del daño espermático durante la criopreservación

En alpaca una de las principales barrera del éxito de la IA u otras técnicas de reproducción asistida es la pobre calidad espermática y la baja concentración de espermatozoides que sobreviven luego de la descongelación.

2.4.1.3 Peroxidación de lípidos

La membrana plasmática de espermatozoides de mamífero, la cual es rica en ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) (Alvarez y Storey, 1995), se puede dañar fácilmente por la reacción entre EROs, tales como OH⁻, y los ácidos grasos poliinsaturados. Este mecanismo es ampliamente conocido como la reacción de peroxidación de lípidos (Agarwal *et al.*, 2003).

La reacción de peroxidación de lípidos resulta en cambios en la fluidez de la membrana espermática y la pérdida de su integridad, así como la pérdida irreversible de la movilidad de los espermatozoides (Storey, 1997). Se ha reportado que la peroxidación de lípidos reduce la capacidad de los espermatozoides humanos para penetrar ovocitos libres de zona en hámster (Aitken, 1989) y también está relacionada con roturas de la cadena de ADN (Baumber *et al.*, 2003).

2.5 Antioxidantes

Los antioxidantes actúan como agentes protectores contra el daño celular inducido por EROs y otros radicales libres (Halliwell, 1997). Se clasifican en dos categorías funcionales, enzimáticos y no enzimáticos (Silva, 2006). Los antioxidantes también se pueden clasificar debido a su solubilidad en agua o en lípidos (Papas, 1999). Los antioxidantes se pueden encontrar en el suero y células de mamífero, también se puede encontrar como un componente en los alimentos. Un bajo nivel de antioxidantes en el sistema del cuerpo o un desequilibrio entre los niveles de antioxidantes y EROs puede conducir a la disfunción de las células y enfermedades. Por lo tanto, los antioxidantes se puede utilizar como medicamento en el tratamiento de enfermedades (Papas, 1999).

2.5.1 Agentes antioxidantes enzimáticos

La función de los antioxidantes enzimáticos es suprimir la formación de radicales libres por la descomposición de ellos (Papavasiliou, 1999), los antioxidantes tienen la función de recoger los radicales libres que pueden causar peroxidación lipídica de la membrana plasmática del espermatozoide (Baumber *et al.*, 2000). Los antioxidantes enzimáticos incluyen la catalasa (CAT), glutatión peroxidasa/reductasa (GPx/GRD) y superóxido dismutasa (SOD) (Irvine, 1996). Estos antioxidantes trabajan juntos para reducir los niveles de radicales libres (Drevet, 2006; Silva, 2006).

2.5.2 Agentes antioxidantes no enzimáticos

La función de los antioxidantes no enzimáticos es inhibir la iniciación de la reacción en cadena, romper la cadena de los estados de propagación en la reacción de peroxidación de lípidos y eliminar otras EROs (Nogushi y Niki, 1999).

Los antioxidantes no enzimáticos también son llamados antioxidantes secuestradores de radicales libres y se clasifican en dos sub-tipos; antioxidantes hidrofílico y lipofílico (Nogushi y Niki, 1999). Ellos incluyen vitamina A (retinol), vitamina C (ácido ascórbico), vitamina E (α -tocoferol), ácido úrico (Nogushi y Niki, 1999; Silva, 2006) y L-cisteína.

2.5.3 Efecto de los antioxidantes sobre el estrés oxidativo y función espermática

Estudios han demostrado que el plasma seminal es una fuente abundante de antioxidantes no enzimáticos tales como vitamina E (α -tocopherol), vitamina C (ácido ascórbico) y glutatión reducido (Saleh and Agarwal, 2002; Silva, 2006), y de antioxidantes enzimáticos tales como superóxido dismutasa (SOD) (Álvarez *et al.*, 1987), Glutatión peroxidasa (GPX), glutatión reductasa (GRD) y catalasa (CAT), estos antioxidantes protegen a los espermatozoides contra la peroxidación lipídica (Saleh and Agarwal, 2002). Además, GPX y SOD están presentes en el epidídimo (Irvine, 1996. Thérond *et al.*, 1996), GPX/GRD y SOD han sido reportados presentes en el citoplasma de la pieza media espermática (Irvine, 1996). Sin embargo, los niveles de antioxidantes naturales en los espermatozoides no son suficientes para proteger totalmente contra el daño inducido por EROs (Irvine, 1996).

La suplementación de dilutores de semen, la medicación oral o alimentos con antioxidantes como GSH, cisteína, vitamina E, vitamina C, taurina, superóxido dismutasa o catalasa se han reportado para mejorarla calidad espermática de muchas especies post-descongelación tales como en humanos (Askari *et al.*, 1994; Suleiman *et al.*, 1996), cerdo (Peña *et al.*, 2003, Funahashi y Sano, 2005; Satorre *et al.*, 2007), toro (Bilodeau *et al.*, 2001), caballo (Almeida y Ball, 2005) y el perro (Michael *et al.*, 2007).

2.6 Antioxidante L-cisteína

2.6.1 Acción antioxidante de L-cisteína sobre espermatozoides congelados

La cisteína, es un aminoácido de bajo peso molecular que contiene un grupo tiol, es un antioxidante no enzimático que es precursor intracelular de la biosíntesis de glutatión y aumento glutatión reducido (GSH) (Bilodeau *et al.*, 2001). L-cisteína juega un rol importante en el mecanismo de protección intracelular contra el estrés oxidativo, estabiliza la membrana e inhibe la capacitación (Johnson *et al.*, 2000). Glutathione es la proteína no tiólica más común en células de mamíferos, la cual protege la membrana plasmática de la peroxidación lipídica, limpia de superóxidos y minimiza la formación de O₂-.El glutatión reducido (GSH) es capaz de actuar directamente en muchos ROS (Meister, 1994), además de ser un cofactor de glutatión peroxidasa (GPx), enzima que cataliza la reducción de peróxido de hidrógeno y dehidroperóxidos. Glutathione peroxidase es una selenocisteína que contiene una enzima antioxidante, que además de ayudar en la eliminación de peróxidos, también actúa en la detoxificación de lípidos (Fridovich, 1983). Además la N-acetil-L-cisteína (una forma de cisteína) se ha demostrado que es ventajoso para la inhibición de la muerte programada (apoptosis) de las células espermáticas en los túbulos seminíferos en humanos (Erkkila *et al.* 1998).

Se ha demostrado que la suplementación de L-cisteína en el dilutor de semen previene la pérdida de movilidad espermática por la reducción de peróxido de hidrogeno de semen criopreservado (FT) en toro (Bilodeau *et al.*, 2001). También se encontró que la suplementación de 5 mM. de L-cisteína mejoró la viabilidad y el estado funcional de espermatozoides de cerdo durante el almacenamiento de refrigerado (Funahashi y Sano, 2005).

L-cisteína también ha mejorado el tiempo de supervivencia de semen y estructura de la cromatina de espermatozoides frescos refrigerados a 15°C (Szczesniak - Fabianczyk *et al.*, 2003). En semen congelado de caninos, Michael *et al.* (2007) describió que la suplementación de L-cisteína resultó en un incremento de la viabilidad y movimiento progresivo rápido estable. Recientemente, Kaeoket *et al.* (2010) sustentó que la suplementación del dilutor (lactosa y yema de huevo) con L-cisteína al 5 y 10 mM. son las concentraciones óptimas para mejorar la calidad de semen post-descongelamiento, aumentando la motilidad progresiva, la viabilidad e integridad del acrosoma).

Un resumen de las principales investigaciones empleando L-cisteína como suplemento del medio dilutor, en diferentes especies, se muestra en la Tabla N° 7.

Tabla N° 7: Investigaciones en suplementación con L-cisteína criopreservación de espermatozoides

Referencia	Especie	Dilutor	Concentración de L-cisteína	Parámetros espermáticos post-descongelación			
				Movilidad (%)	Vitalidad (%)	Integridad membrana plasmática (%)	Integridad membrana acrosomal (%)
Topraggaleh <i>et al.</i> (2013)	<i>Bubalus bubalis</i>	Tris, ácido cítrico, glucosa, yema de huevo, glicerol	Control	56.16 ± 1.67	-	61.17 ± 0.98	-
			5.0 mM	63.55 ± 2.00	-	65.75 ± 1.02	-
			7.5 mM	67.15 ± 1.46	-	70.97 ± 0.85	-
			10.0 mM	53.43 ± 2.58	-	64.32 ± 0.87	-
Barros <i>et al.</i> (2013)	<i>Equus Caballus</i>	Botu Crio	Control	52,32 ± 6,8	-	60,01±12,89	85,51±1,92
			0,5 mM	56,88 ± 13,8	-	49,93±8,58	82,10±2,92
			1 mM	48,28 ± 14,3	-	47,50±13,86	82,56±6,69
El-Sheshtawy <i>et al.</i> (2012)	<i>Bos taurus</i>	Tris, ácido cítrico, fructosa, yema de huevo, Tris-citric acid-fructose-egg-yolk (TCFY)-diluent	Control	47.08 ±0.57	53.33 ±3.33	-	-
			2 mM	38.75 ±0.65	51.67 ±1.67	-	-
			10 mM	48.33 ±0.71	51.67 ±1.67	-	-
Chanapiwat <i>et al.</i> (2012)	<i>Sus scrofa</i>	Lactosa, yema de huevo-egg-yolk-base extender	Control	26.7 ± 2.2a	32.3 ± 1.8	16.7 ± 1.3	41.2 ± 1.9
			290 mg DHA y 5 mM	38.3 ± 2.2	39.1 ± 2.0	17.9 ± 1.1	44.9 ± 2.1

Tabla con formato

Con formato: Color de fuente: Automático

Con formato: Centrado, Posición: Horizontal: Centro, Con relación a: Margen

Con formato: Centrado, Posición: Horizontal: Centro, Con relación a: Margen

Con formato: Centrado, Posición: Horizontal: Centro, Con relación a: Margen

Con formato: Español (alfab. internacional)

Con formato: Centrado, Posición: Horizontal: Centro, Con relación a: Margen

Con formato: Centrado, Posición: Horizontal: Centro, Con relación a: Margen

Con formato: Justificado, Posición: Horizontal: Centro, Con relación a: Margen

			290 mg DHA y 10 mM	39.0 ± 1.9	43.1 ± 1.9	18.4 ± 1.2	47.6 ± 1.9
Çoyan <i>et al.</i> (2011)	<i>Ovis aries</i>	Tris-ácido cítrico, fructosa, yema de huevo-y , glicerol	Control	69.0 ± 2.3	-	60.4 ± 1.8	36.42 ± 2.6
			1 mM	74.3 ± 2.0 abe	-	67.6 ± 3.8	39.2 ± 2.6
			2 mM	72.5 ± 2.8 abe	-	72.8 ± 6.9 a	34.5 ± 3.8
			4 mM	67.5 ± 4.3 c	-	60.7 ± 1.7	40.0 ± 7.4
Ansari <i>et al.</i> (2011)	<i>Bos taurus</i>	Tris-ácido cítrico, fructosa, yema de huevo-y , glicerol	Control	41.7±2.9	61.7±2.5	40.0±2.6	60.3±3.1
			0.5 mM	41.7±3.0	62.7±1.5	40.0±2.6	60.0±1.7
			1.0 mM	56.7±2.9	73.3±1.5	54.7±3.8	70.7±1.2
			2.0 mM	58.3±2.9	79.3±4.2	56.0±2.6	77.0±3.5
Beheshti <i>et al.</i> (2011)	<i>Bubalus Bubalis</i>	Tris- ácido cítrico, fructosa, Yema de huevo y glicerol	Control	45.86 ± 0.36	51.55± 0.33	-	68.38± 0.23
			0.1 mM	44.91 ± 0.36	55.71 ± 0.20	-	67.85 ± 0.52
			1 mM	52.95 ± 0.15	59.43 ± 0.19	-	68.10 ± 0.76
			2.5 mM	57.90 ± 0.13	66.15 ± 0.24	-	67.98± 0.11
			5 mM	58.20 ± 0.14	68.26 ± 0.20	-	68.46± 0.20
			7.5 mM	59.10 ± 0.16	69.20 ± 0.24	-	67.85± 0.52
Tuncer <i>et al.</i> (2010)	<i>Bos taurus</i>	Laiciphose extender	Control	52.22 ± 2.46	-	48.22 ± 3.43	-
			5 mM	48.61 ± 4.60	-	47.83 ± 3.90	-

Con formato: Centrado

Con formato: Centrado

Con formato: Centrado

Con formato: Centrado

			10 mM	48.06 ± 4.69	-	54.39 ± 4.75	-
Anghel <i>et al.</i> (2010)	<i>Capra aegagrus</i>	375mM Tris-375mM, 124 mM ácido cítrico cítrico-124 mM, 41.6mM glucosa 41.6mM, 20% (v/v) yema de huevo-20% (v/v), 5% (v/v) glicerol, (pH=6.8)	Control	47.81 ± 0.21	49.91 ± 1.25	46.18 ± 1.30	-
			5mM	48.5 ± 1.56	50.32 ± 1.82	47.57 ± 1.18	-
			10mM	51.31 ± 1.08	51.50 ± 0.89	50.25 ± 1.22	-
Chanapiwat <i>et al.</i> (2010)	<i>Sus scrofa</i>	Modena extender I lactosae-yema de huevoegg yolk (LEY) extender II	Control	17.6±9.1	28.9±6.8	-	18.7±6.5
			5 mM	28.8±13.9	44.5±5.2	-	32.8±10.3
			10 mM	34.4±13.5	50.5±5.9	-	41.3±10.2
			15 mM	15.8±8.2	32.5±8.3	-	26.3±11.1
Bucak <i>et al.</i> (2008)	<i>Akkaraman ramsOvis aries</i>	Tris, ácido cítricoeitríe acid, fructosa, yema de huevoegg yolk, glycerol	Control	47.50±4.33	23.25±5.28	44.00±1.23	-
			5 mM	61.00±1.87	27.00±3.07	42.00±7.56	-
El-Sheshtawy <i>et al.</i> (2008)	<i>Bubalus Bubalis</i>	Tris, cCitrato,e Fructosa, yema de huevo e-Yolk (TCFY)	-	32.50±1.53	-	41.10 ± 1.66	50.30±2.89
			-	42.50±3.96	-	53.90±1.98	58.30±2.99
Chanapiwat <i>et al.</i>	<i>Sus scrofa</i>	Dilutor I: Modena™		23.7 ± 7.7	46.4 ± 13.3	17.4 ± 9.5	31.9 ± 12.1

Con formato: Centrado

Con formato: Centrado

Con formato: Español (alfab. internacional)

Con formato: Fuente: Cursiva

Con formato: Centrado

Con formato: Español (alfab. internacional)

Con formato: Español (alfab. internacional)

Con formato: Español (alfab. internacional)

Con formato: Centrado

Con formato: Centrado

(2008)		Dilutor II: lactosa-yema de huevo	Control				
		Dilutor III: diluto g II, glycerol y Equex-STM®	5 mM	35.3 ± 11.7	51.6 ± 12.8	19.5 ± 8.2	41.8 ± 15.6
Uysal <i>et al.</i> (2007)	<u>Ovis</u> aries Akkara man-rams	Tris, fructosa, ácido cítrico, yema	Control	39.5 ± 2.73	-	36.9 ± 4.40	-
			5 mM	45.0 ± 3.42	-	42.7 ± 5.74	-
			10 mM	59.0 ± 4.35b	-	40.7 ± 4.74	-
			20 mM	39.5 ± 3.31a	-	32.4 ± 5.37	-
Uysal <i>et al.</i> (2007)	<i>Bos taurus</i>	Tris, fructosa, ácido cítrico, yema, glicerol	Control	53.0 ± 3.2	-	59.2 ± 3.4	-
			5 mM	44.0 ± 3.1	-	51.3 ± 3.3	-

Con formato: Centrado

Con formato: Centrado

Fuente: Recopilación de investigaciones referenciadas en la misma Tabla N° 7.

2.7 Biotecnología de la Reproducción en Alpaca macho

En toda crianza animal, el macho cumple un rol preponderante tanto en el proceso reproductivo como en el mejoramiento genético: de su correcta selección y los cuidados que se le prodigan depende el éxito de la explotación (Fernández - Baca, 1991). La selección de los machos en alpaca, ha estado dirigida solo a aspecto de conformación y fibra de color blanco, dejando de lado las características reproductivas. Una consecuencia de esto es la alta incidencia de anormalidades de los genitales de los machos reproductores, la mayoría de naturaleza hereditaria.

Los esfuerzos para el desarrollo y aplicación de biotecnologías reproductivas no siempre han sido desarrollados en forma programada y continua, sino como esfuerzos individuales y aislados e incluso algunos investigadores consideran que no es posible desarrollar y aplicar estas tecnologías por los pobres resultados obtenidos. Sin embargo, el desarrollo de estas biotecnologías ha requerido la mejora del conocimiento sobre la fisiología reproductiva de esta especie, contando con la ayuda de técnicas como la ultrasonografía.

Los reportes sobre métodos de colección de semen son diversos, desde el uso de sacos vaginales (Mogrovejo *et al.*, 1952), esponjas vaginales (San Martín, 1961) y electroeyaculación (Fernández-Baca y Calderón, 1965; Calderón W., 1968); con las consiguientes dificultades para los machos durante la copula y la calidad del semen. Los estudios sobre conservación de semen no son totalmente satisfactorios, particularidades como la alta viscosidad del semen de alpacas (Bravo *et al.*, 1997b) se constituyen en factores que dificultan el desarrollo de las técnicas de conservación., dificultando la determinación de la concentración, morfología y movilidad espermática, además del alto porcentaje de espermatozoides anormales (Fernández- Baca, 1993) y una movilidad oscilatoria.

La IA con semen congelado es una de las más importantes tecnologías reproductivas en la producción de animales domésticos y combinada con una prueba de progeñe, ha contribuido sustancialmente en el mejoramiento genético de bovinos lecheros, especialmente cuando fue posible disponer de semen congelado de toros de alta calidad genética. En camélidos, si bien existen reportes sobre el desarrollo de la IA y aun cuando puede ser considerada una alternativa tecnológica, aun no se han superado las limitantes existentes, como el desarrollo de protocolos de criopreservación, limitando por ahora al desarrollo de la Inseminación Artificial con el uso de semen fresco (Huanca y Adams, 2007), con las consiguientes dificultades para permitir una amplia difusión de reproductores genéticamente superiores.

Los resultados obtenidos sugieren que es posible la colección de semen con vagina artificial colocada en un maniquí y envuelta con una frazadilla eléctrica, así como el desarrollo de la IA con semen fresco; sin embargo se requieren nuevos estudios que permitan desarrollo protocolos de criopreservación de semen, por lo que parece que el uso de la IA en camélidos va a estar, por ahora, restringido al uso de semen fresco diluido y utilizado inmediatamente, con resultados cercanos al 50 %.

2.7.1 Criopreservación en espermatozoides de Alpaca

En comparación con otras especies de animales domésticos como toro, cerdo, oveja, caballo, cabra, etc.; hay pocas investigaciones sobre las metodologías de congelación de espermatozoides ya sea proveniente de eyaculado o de cola de epidídimo de alpaca. En consecuencia, los parámetros que afectan la eficiencia de la criopreservación, desde el método de colección, el tipo de dilutor y crioprotector, la concentración del crioprotector, las tasas de congelación y descongelación, y el tipo de empaquetado aún no han sido dilucidadas en esta especie.

Investigaciones realizadas (Tabla N° 8) han empleado diferentes criodiluyente para criopreservar semen de alpaca, tales como el citrato (Aller *et al.*, 2003; Bravo *et al.*, 1996; 2000; Morton *et al.*, 2007), Biladyl, Green Buffer, Triladyl (Vaughan *et al.*, 2003) y Tris (Morton *et al.*, 2007; Santiani *et al.*, 2005). Bravo *et al.* (1996) reportó una de las metodologías más exitosas en criopreservación de espermatozoides de alpaca, usando citrato como criodiluyente; se evidenciaron altas tasas de supervivencia espermática y la movilidad total post-descongelación fue de 46,7%, con un 54,9% de la movilidad inicial mantenida después de la congelación y descongelación. Sin embargo, los datos facilitados por los autores no son suficientes para permitir la replicación del método.

Estudios posteriores han reportado un descenso considerable de la movilidad post-descongelamiento con respecto a la muestra inicial, donde valores de 60-98% en muestras de semen frescas descienden hasta 15-20% luego del descongelamiento (Valdivia *et al.*, 1999). Un estudio para evaluar dos dilutores y dos crioprotectores en criopreservación de semen de alpaca, concluyó que el dilutor con leche descremada-yema-fructosa y el crioprotector etilenglicol brindaron los mejores resultados, obteniendo una tasa de movilidad post-descongelamiento de 20% y 18.7% de espermatozoides viables con acrosoma íntegro al descongelamiento (Santiani *et al.*, 2005). En términos generales la criopreservación de semen en alpacas ha tenido poco éxito, siendo uno de los menos exitosos, el trabajo publicado por Vaughan *et al.* (2003), con 6% de movilidad post-descongelamiento.

Debido a las características propias del semen, falta de conocimiento sobre su composición, alta viscosidad y la técnica de colección; los investigadores optaron por trabajar con espermatozoides de cola de epidídimo ya que siendo libre de plasma seminal es fácil de manejar y diluir. Los primeros reportes en criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca emplearon una concentración final de glicerol al 3%, y mostraron un 18% de movilidad con 80% de integridad acrosomal post-descongelamiento (Morton *et al.*, 2007). El mismo grupo de investigadores desarrolló otra metodología de criopreservación de espermatozoides epididimarios con glicerol al 3-4% y una concentración final de 1% de EquexSTM® en el criodiluyente (Morton *et al.*, 2010). En tanto que Gonzales *et al.* (2008) reporta una tasa de supervivencia de solo 5% con espermatozoides epididimarios de alpaca. También se ha evaluado el efecto de la adición de plasma seminal en la criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca, encontrándose que no hay diferencias en diversos parámetros espermáticos concluyendo que no existe un efecto protector por parte del plasma seminal (Rodríguez, 2009).

Igualmente existe poca información sobre el uso de otros dilutores, reportándose el uso de yema de huevo – citrato (Pacheco *et al.*, 1996), solución de PBS - Suero de cría de alpaca (de la Vega, 1996). Raymundo *et al.* (2000) evaluó el uso de diferentes combinaciones de dilutores: tris – citrato - yema de huevo – glucosa, tris – citrato - yema de huevo – fructosa y el dilutor comercial Continental para cerdos; en todos los casos los resultados indicaron que el porcentaje de movilidad espermática post descongelación disminuía en relación directa al tiempo de conservación, 42% a los 30min, 33% a 1h, 16% a las 2h, 5.5% a las 3h y 1.8% a las 6h.

Los reportes sobre semen congelado son muy escasos; así tenemos que un estudio realizado con semen obtenido por electroeyaculación y diluido con Tris – Yema huevo – Glicerol, solo se observó un 10 % de movilidad post descongelamiento (McEvoy *et al.*, 1992); así mismo, otro estudio con semen tratado con colagenasa y posteriormente diluido con citrato de sodio – Yema huevo – Glicerol (7 %) permite obtener una movilidad entre el 30 – 40 % (Bravo, 1996). El uso de etilenglicol como agente crioprotector ha sido reportado, permitiendo una tasa de movilidad pos descongelamiento del 20 % (Santiani *et al.*, 2005). A pesar de estos resultados a la fecha no se ha reportado estudios que nos permitan señalar la factibilidad de congelar semen de camélidos. Posiblemente, como sucede con otras especies, no va a ser fácil congelar semen, más aún si a las dificultades de contar con un dilutor apropiado, hay que considerar los altos porcentajes de anomalías presentes en los eyaculados.

Tabla N° 8: Investigaciones en criopreservación de espermatozoides en alpaca

Referencia	Diluyente y crioprotector	Método de congelación	post descongelación		
			Movilidad (%)	Integridad de membrana plasmática (%)	Integridad de membrana acrosomal (%)
Santiani <i>et al.</i> (2013)	Leche descremada-yema de huevo-fructosa / Etilenglicol + Tempo 1 mM	Pajillas 0.25, expuestas a 10cm de vapores de nitrógeno por 15 min	19.75 ± 2.29	14.48 ± 2.17	30.66 ± 2.68
	Leche descremada-yema de huevo-fructosa / Etilenglicol + Tempol 1 mM		22.08 ± 3.06	13.12 ± 2.16	32.71 ± 3.74
Morton <i>et al.</i> (2010)	Lactosa-yema de huevo-Equex STM / 2% Glicerol	Los espermatozoides fueron congelados como pellet sobre hielo seco	16.1 ± 4.6	-	83.6 ± 1.6
	Lactosa-yema de huevo-Equex STM / 3% Glicerol		20.5 ± 5.9	-	81.3 ± 2.0
	Lactosa-yema de huevo-Equex STM / 4% Glicerol		18.5 ± 6.6	-	84.8 ± 2.0
	Biladyl®-yema de huevo / 3% Glicerol		14.4 ± 2.1	-	89.6 ± 1.2
	Biladyl®-yema de huevo- Equex STM®		21.5 ± 3.5b	-	91.1 ± 1.4
Banda <i>et al.</i> (2010)	Dilutor I: Tris, ácido cítrico, fructosa y yema de huevo	Protocolo de criopreservación controlado-lento con el software Cryogenesis 4.0. Pajillas de 0.25 ml	14.0 ± 7.5	24.3 ± 9.6	32.6 ± 15.6
	Dilutor II: glicerol, EDTA, trehalosa,				
	Diluto I: Tes, Tris, citrato de sodio y yema de huevo, Dilutor II: Tes, Tris, citrato de sodio y yema de		8.6 ± 3.8	19.1 ± 5.6	26.3 ± 17.3

	huevo / 0.385M DMA				
	Dilutor I: leche descremada, yema de huevo, fructosa. Dilutor II: leche descremada, yema de huevo, fructosa / etilenglicol 0.2 M.	-	17.0 ± 4.3	17.9 ± 5.5	27.2 ± 13.5
Canorio (2009)	Tes, Tris, citrato de sodio, yema / DMA 0.75M	Protocolo de criopreservación controlado-lento con el software Cryogenesis 4.0. Pajillas de 0.25ml,	36.049	48.00	-
	Tes, Tris, citrato de sodio, yema / DMA 0.375M		35.92	50.93	-
	Tes, Tris, citrato de sodio, yema / DMA 0.18M		33.46	47.05	-
	Tes, Tris, citrato de sodio, yema / DMSO 0.5M		28.44	43.92	-
	Tes, Tris, citrato de sodio, yema / DMSO 0.25M		35.34	46.26	-
	Tes, Tris, citrato de sodio, yema / DMSO 0.125M		32.86	45.75	-
Rodríguez (2009)	Tes, Tris, citrato de sodio, yema / DMA0.375M	Protocolo de criopreservación controlado-lento con el software Cryogenesis 4.0. Pajillas de 0.25ml,	13.59 ± 2.00	52.01 ± 1.38	21.99 ± 4.19
	Tes, Tris, citrato de sodio, yema / DMA0.375M + plasma seminal intacto		16.31 ± 2.4	53.34 ± 1.95	21.40 ± 3.78
	Tes, Tris, citrato de sodio, yema / DMA0.375M + plasma seminal denaturado		11.68 ± 1.54	45.04 ± 2.01	22.67 ± 2.70
Morton <i>et al.</i> (2007)	Dilutor I: Lactosa, yema de huevo Dilutor II: Lactosa, yema de huevo / 3% glicerol, 1.5 % Equex STM®	Pellets (250µL) en hielo seco	18.2±5.7	80.0±2.2	-
	Dilutor I: Citrato de sodio, glucosa, yema de huevo Dilutor II: Citrato de sodio, glucosa, yema de huevo / 3% glicerol		6.9±2.3	79.0±1.0	-
	Dilutor I: Tris, ácido cítrico, glucosa, yema de huevo / 3% glicerol		11.3±3.0	83.4±2.2	

	Dilutor I: Lactosa, yema de huevo Dilutor II: Lactosa, yema de huevo / 3% glicerol, 1.5 % Equex STM®	Pellets (250µL) en hielo seco	27.0±5.2	-	87.5±1.2
		Pajillas 0.25ml en hielo seco	5.5±1.1	-	88.3±1.1
		Pajillas 0.5ml en hielo seco	5.0±1.6	-	81.0±2.2
		Pajillas 0.25ml en vapores de nitrógeno líquido	8.6±1.8	-	89.8±1.6a
		Pajillas 0.5ml en vapores de nitrógeno líquido	10.0±2.4	-	89.0±1.5
Perez (2005)	BSA-glucosa, 10% yema de huevo, 2.5% glicerol (final [] no espec.)	Pajillas 0.25ml en vapores de nitrógeno líquido	22.5	-	-
	BSA-glucosa, 10% yema de huevo, 5.0% glicerol (final [] no espec.)		27.7	-	-
	BSA-glucosa, 10% yema de huevo, 7.5% glicerol (final [] no espec.)		34.4	-	-
	BSA-glucosa, 20% yema de huevo, 2.5% glicerol (final [] no espec.)		31.4	-	-
	BSA-glucosa, 20% yema de huevo, 5.0% glicerol (final [] no espec.)		39.2	-	-
	BSA-glucosa, 20% yema de huevo, 7.5% glicerol (final [] no espec.)		41.0	-	-
	BSA-glucosa, 30% yema de huevo, 2.5% glicerol (final [] no espec.)		32.4	-	-
	BSA-glucosa, 30% yema de huevo, 5.0% glicerol (final [] no espec.)		36.2	-	-
	BSA-glucosa, 30% yema de huevo, 7.5% glicerol		38.7	-	-

	(final [] no espec.)				
Santiani <i>et al.</i> (2005)	Tris-ácido cítrico-glucosa-yema de huevo / Glicerol	Pajillas 0.25ml en vapores de nitrógeno líquido por 15 min	4.0 ± 1.1	-	-
	Tris-ácido cítrico-glucosa-yema de huevo / Etilenglicol		1.0 ± 1.4	-	-
	Leche descremada-yema de huevo-fructosa / Glicerol		15.3 ± 4.1	-	-
	Leche descremada-yema de huevo-fructosa / Etilenglicol		20.0 ± 6.7	-	-
Vaughan <i>et al.</i> (2003)	Green buffer, 20% yema de huevo / 7% Glicerol. 2 pasos de dilución	Pajillas 0.50ml. Mantener a 4 °C por 1.5 h, luego a 10cm vapores de nitrógeno líquido por 30 Min	Biladyl: 21.3 ± 3.3 %	-	-
	Biladyl, 20% yema de huevo / 7% glicerol. 2 pasos de dilución		Buffer Green: 17.4 ± 1.7 %	-	-
Bravo <i>et al.</i> (2000)	Citrato	Pajillas 0.25ml. Mantener a 4 °C por 1 h, luego a 5cm vapores de nitrógeno líquido y sumergir	Resultados no mostrados	-	-
Bravo <i>et al.</i> (1996)	Citrato, glucosa, 20% yema de huevo/ Glycerol 2 pasos de dilución (no indica la tasa de dilución)	Pajillas 0.25ml. Mantener a 4 °C por 1 h, luego a 5cm vapores de nitrógeno líquido y sumergir	Inicial: 85% Post descongelación: 46.7%	-	-

Fuente: Adaptado de Morton *et al.* (2008).

2.8 Pruebas de evaluación espermática

La calidad de los espermatozoides pueden ser analizados tanto por pruebas para evaluar la integridad estructural y funcionalidad de los espermatozoides.

2.8.1 Movilidad espermática

La movilidad se ha evaluado como principal parámetro para evaluar la disminución de la capacidad fecundante, la técnica ampliamente empleada es una estimación subjetiva (Hirai *et al.*, 2001), sin embargo técnicas modernas para evaluar la calidad espermática han sido desarrolladas con el fin de reducir la subjetividad de las pruebas y mejorar la predicción de la fertilidad.

2.8.2 Integridad de membrana plasmática

Existen varios parámetros que determinan la capacidad fecundante de los espermatozoides, incluyendo la evaluación de la integridad de la membrana plasmática y la verificación de su funcionalidad. La prueba de permeabilidad de membrana, conocido como test hipoosmótico, está basada en las propiedades físicas y bioquímicas de la membrana plasmática, evalúa la capacidad de la membrana del espermatozoide para transportar fluidos.

Esta prueba mide la integridad funcional de la membrana espermática basado, en la incubación del espermatozoide en un medio hiposmótico (baja osmolaridad), es decir si la membrana está intacta entonces el agua entrará en la célula para alcanzar el equilibrio osmótico, indicando si la membrana plasmática intacta está funcionalmente integra y bioquímicamente activa (Cabrita *et al.*, 1999; Vázquez *et al.*, 1997). El influjo de agua causa un incremento de volumen celular, manifestándose en un hinchamiento del espermatozoide enrollamiento del flagelo como se puede observar la figura N°6. La capacidad de enrollamiento del flagelo del espermatozoide es una evidencia que el transporte a través de la membrana es normal, siendo un indicador tanto de la integridad como de la funcionalidad de la membrana (Camacho, 2000).

El test hipoosmótica es simple, barato y de fácil aplicación, y muestra una correlación positiva entre la función de la membrana plasmática y la capacidad de fertilizar (Petrunkina *et al.*, 2001; Rota *et al.*, 2000). La integridad de la membrana plasmática es esencial para la función de los espermatozoides. Sólo una célula intacta es capaz de causar una serie de cambios en el tracto reproductor femenino, lo que permite la capacitación, reacción del acrosoma y finalmente, la adquisición de la capacidad de fertilizar un ovocito (Petrunkina *et al.*, 2001).

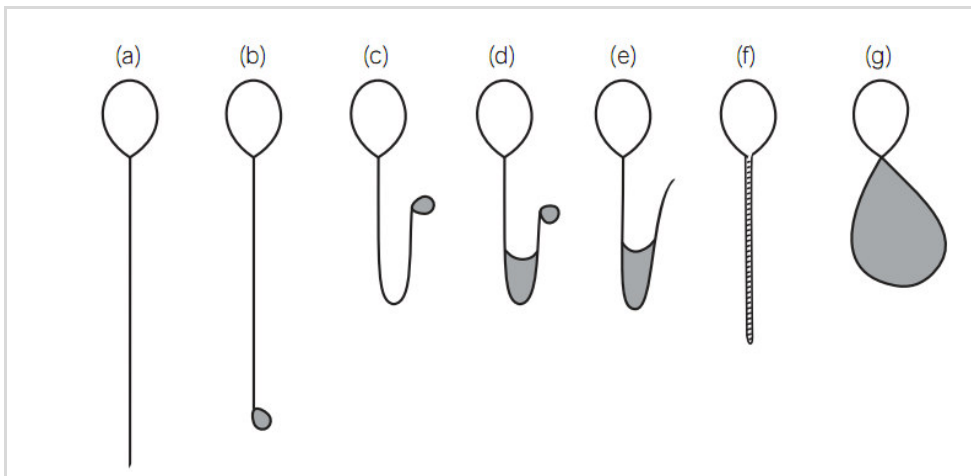


Figura N° 6: Diferentes formas de endosmosis

Test hiposmótico (HOST): Representación esquemática de los cambios morfológicos en los espermatozoides de humanos, tras someterlo a estrés hipoosmótico. A) Endosmosis negativa, B-G) distintos cambios morfológicos en la cola del flagelo que corresponden a una endosmosis positiva. Fuente: Jeyendran *et al.* (1984).

2.8.3 Integridad de la membrana acrosomal

Además de la membrana plasmática, otros factores son esenciales para determinar el éxito de la fecundación. Una es la integridad de la membrana acrosomal, la cual es indispensable para que ocurra la reacción del acrosoma. La integridad de la membrana acrosomal es importante para que ocurra la fecundación, ya que la reacción del acrosoma se caracteriza por la liberación de enzimas acrosomales, y es un evento esencial para que el espermatozoide penetre la zona pelúcida y ocurra la fusión con la membrana plasmática del ovocito (Celeghini *et al.*, 2007; Flesch y Gadella, 2000). La integridad puede ser identificada por varias técnicas de fluorescencia, por doble o triples tinciones.

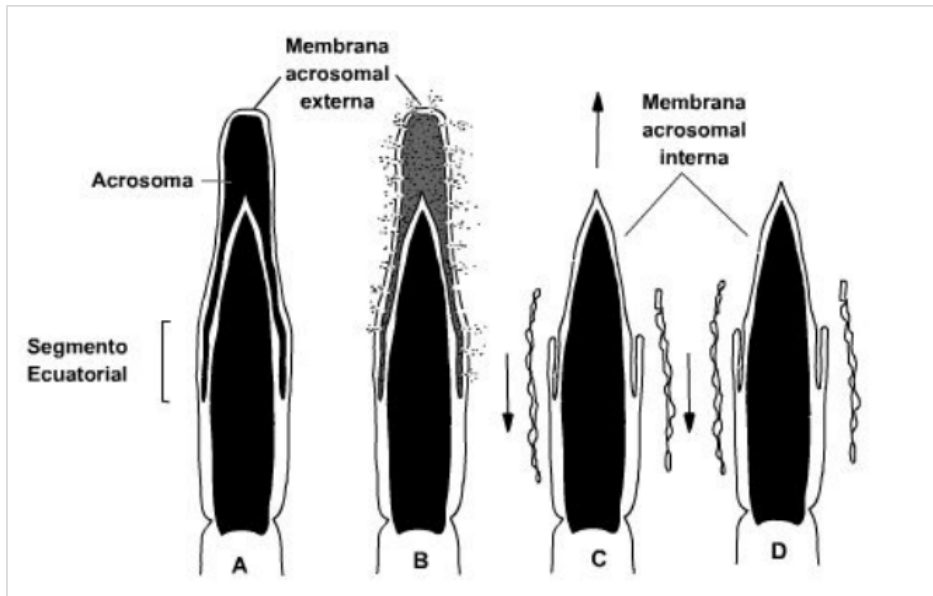


Figura N° 7: Reacción acrosomal

A) Espermatozoide con el acrosoma intacto, B-C) vesiculación de membranas y liberación de contenido acrosomal y D) la membrana acrosomal interna queda como única envoltura de la región anterior de la cabeza del espermatozoide. Fuente: Guyton y Hall, (2000).

2.8.4 Integridad del ADN

Además de la integridad de la membrana plasmática y acrosomal, la compactación del ADN es otro factor que puede alterar las tasas de fecundidad. Alteraciones en el complejo ADN-proteína se han identificado recientemente, como una causa importante de infertilidad en humanos (Costa, 1996). Existen varias técnicas que pueden determinar la condensación del ADN, incluyendo naranja de acridina, TUNEL, ensayo Cometa y metacromasia inducida mediante el uso de azul de toluidina.

3. HIPÓTESIS Y VARIABLES

3.1 Hipótesis

3.1.1 Hipótesis de investigación

La suplementación de L-cisteína al medio dilutor Tes-Tris-Yema mejora la calidad de los parámetros espermáticos post descongelación de espermatozoides epididimarios de alpaca.

3.1.2 Hipótesis nula:

La suplementación de L-cisteína al medio dilutor Tes-Tris-Yema no mejora la calidad de los parámetros espermáticos post descongelación de espermatozoides epididimarios de alpaca.

3.2 Variables

3.2.1 Variable independiente:

La concentración del antioxidante no enzimático L-cisteína, en el dilutor de criopreservación.

3.2.2 Variable dependiente:

Movilidad, vitalidad, integridad de membrana e integridad acrosomal espermática.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto potencial de la suplementación de L-cisteína al medio dilutor Tes-Tris-Yema sobre fisiología de espermatozoides epididimarios post descongelación en alpacas

4.2 Objetivos específicos

- Evaluar los parámetros fisiológicos de movilidad, vitalidad e integridad funcional de membranas antes y después del proceso de criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca.
- Evaluar el efecto de la suplementación de L-cisteína al medio dilutor Tes-Tris-Yema sobre los parámetros fisiológicos de movilidad, vitalidad e integridad funcional de membranas post-descongelación en espermatozoides epididimarios de alpaca.
- Comparar los efectos de las diferentes concentraciones de L-cisteína sobre el medio dilutor, y recomendar la concentración más adecuada para criopreservar espermatozoides epididimarios de alpaca.
- Evaluar el efecto de L-cisteína sobre la integridad de membrana y viabilidad del acrosoma de espermatozoides epididimarios de alpaca post descongelación mediante la técnica de doble tinción azul de tripán-giemsá.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Materiales

5.1.1 Material biológico

Se utilizan muestras de testículo de dieciséis machos entre 4 a 6 años de edad de alpacas de la raza Huacaya, las cuales fueron obtenidas del Camal Municipal de Huancavelica, en la provincia de Huancavelica (3800 m.s.n.m., se registra una temperatura máxima de 20 °C y mínima de 3 °C, con un promedio anual de 9.2 °C). Las colectas fueron realizadas interdiario, durante cinco semanas, en el periodo comprendido entre diciembre del 2011 y enero del 2012.



Figura N° 8: Alpacas raza Huacaya del Camal Municipal de Huancavelica

5.1.2 Reactivos

- L-cysteina (SIGMA Cód. C7352)
- Dimetilacetamida (DMA) (SIGMA Cód. D5511)
- Citrato de sodio (SIGMA Cód. S4641)
- Tetrafenil Fosfonio Cloruro - Tes (SIGMA Cód. T1375)
- Trizma Base (SIGMA Cód. T6066)
- Estreptomicina (SIGMA Cód.S1277)
- Penicilina (SIGMA Cód.P3032)
- Medio HAM-F10 (SIGMA Cód. N6635)
- Lactato de calcio (SIGMA Cód.L4388)
- Bicarbonato de sodio, NaHCO_3 (SIGMA Cód.S7277)
- D-fructosa (SIGMA Cód.F3516)
- NaCl (SIGMA Cód.S5886)

- KCl (SIGMA Cód.P9333)
- Fosfato de sodio dibásico, Na_2HPO_4 (SIGMA Cód.F3516)
- Fosfato de potasio monobásico, KH_2PO_4 (SIGMA Cód.P5379)
- Azul de tripán (SIGMA Cód. 302643)
- Giemsa (Azur eosina azul de metileno)
- Paraformaldehído (SIGMA Cód. P6148)
- Entellan (Merck HX787224)
- Hidróxido de sodio (NaOH)
- Citrato de sodio dihidrato ($\text{Na}_3\text{CHO} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- Agua de inyección estéril
- Solución de cloruro de sodio al 0.9%.
- Solución de eosina Y
- Aceite de inmersión
- Agua destilada
- Alcohol
- Huevo de gallina

5.1.3 Equipos e instrumentos

- Freeze control CRYOBATH CL-3300, made in Australia by Cryologic
- Tanque de nitrógeno líquido, TAYLOR-WHARTON (TW) VHC 35, very high capacity
- Microscopio óptico LW Scientific I-4 Series
- Microscopio de fluorescencia
- Centrifuga (International Clinical Centrifuge, made in USA by International Equipment Co. Model CL A3264X-2)
- Cámara de flujo laminar (BELNET)
- Incubadora (Forma Scientific, Inc. CO_2 Water jacketed incubator, Model 3110 Series)
- Balanza analítica (Sartorius, Model TE64)
- Micropipeta de 10 μl , 100 μl y 1000 μl
- Jarra eléctrica
- Cronómetro digital
- Estufa de 37°C
- Filtros de 0.22 μm

5.1.4 Material de plástico, metal y vidrio

- Pajillas de criopreservación de 250 µl (MINITUB, Germany)
- Cámara neubauer (MARIENFELD, Germany)
- Microtubos de 1.5 ml (BIOLOGIX, USA)
- Termómetro
- Pinza con muesca para pajillas
- Tips de 10 µl, 100 µl y 1000 µl
- Tubos de plástico de centrifuga de 15 ml. (BIOLOGIX, USA)
- Placas petri de vidrio
- Láminas portaobjeto y láminas cubreobjeto de vidrio
- Papel de parafilm

5.1.5 Soluciones

- **Medio criopreservación: Tes-Tris-Yema:**

- Pesar y disolver 3.0317 g de Tes en un vaso estéril, luego agregar 0.7203 g de Tris y enrasar hasta 70 ml de agua ultrapura o de inyección estéril.
- En otro vaso disolver 0.445 g Citrato de sodio en 12.5 ml de agua ultrapura o de inyección estéril.
- Filtrar las soluciones por separado (dentro de un recipiente estéril) con filtros de membrana, con un tamaño de poro de 0.22 µm en la cámara de flujo laminar.
- Lavar con alcohol el huevo, abrirlo en una placa petri y recuperar las yemas con una micropipeta.
- Para obtener un volumen final de 100 ml, mezclar 70 ml de solución TES-Tris, agregar 12.5 ml de citrato de sodio y 17.5 ml de yema de huevo.
- Transferir (alícuotar) a tubos centrifuga estériles y centrifugar la solución final a 10000rpm por 60 minutos.
- Recuperar el sobrenadante y descartar el pellet.
- Agregar 10 ml de solución antibiótica.
- Almacenar en alícuotas a -20°C.

- **Solución de antibióticos:**

- Pesar 0.059 g de penicilina y 0.1 g de estreptomicina, disolver en 10 ml de agua destilada y filtrar la solución.

Tabla N° 9: Composición del medio dilutor Tes-Tris-Yema

Reactivo/insumo	Cantidad	Porcentaje
Citrato de sodio	0.445 g	5%
Tes	0.7203 g	2%
Trizma base	3.0317 g	8%
Yema de huevo	17.5 ml	20%
Solución de antibióticos	10 ml	1:1000
Volumen total	100 ml	

Fuente: Canorio (2009)

▪ **Medio de cultivo:**

- Medio HAM-F10: suplementado con 0.075 g de penicilina, 0.075 g de estreptomicina, 0.245 g de lactato de calcio, y 2.1 g de bicarbonato de sodio, para un volumen final de 1 l.

▪ **Medios de evaluación:**

- Solución hipoosmótica: Pesar 0.1470 g de citrato de sodio dihidrato ($\text{Na}_3\text{CHO} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 0.2702 g de D-fructosa, y disolver en 20 ml de agua de inyección estéril.
- Solución de eosina Y 0.5% (w/v): Pesar 0.5 g de eosina Y, y disolver en 100 ml de Cloruro de sodio (NaCl) al 0.9%.

▪ **Medio de lavado:**

- Buffer fosfato salino (PBS 10X): Pesar 8 g de NaCl, 0.2 g de KCl, 1.4 g de Na_2HPO_4 , y 0.24 g KH_2PO_4 y disolver en 100 ml de agua estéril.



Figura N° 9: Preparación del medio dilutor Tes-Tris-Yema, lavado, cultivo y evaluación

5.2 Metodología

5.2.1 Colección de las muestras

Los testículos fueron colectados en un termo, conteniendo suero fisiológico a 4°C, inmediatamente después del sacrificio del animal y transportados al Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la Universidad Nacional de Huancavelica para su evaluación y criopreservación. Sólo se trabajó con testículos mayores a 4 cm de largo (Smith, 1999; Brown, 2000; Galloway, 2000) y que a simple vista no mostraron ninguna anomalía en su morfología.

5.2.2 Procesamiento y evaluación de las muestras

Seguido de la colecta de muestras, el procedimiento y evaluación de testículos se realizó por cada individuo; se procedió a la i) disección del par de testículos, ii) retiro de la túnica albugínea, iii) aislamiento de la cola del epidídimo, limpiándolo del tejido conectivo y restos de sangre, iv) recuperación de espermatozoides de ambas colas del epidídimo, en 1 ml de suero fisiológico previamente atemperado en una placa petri pequeña e v) incubación de la muestra de espermatozoides a 37°C hasta su evaluación luego de 10 minutos. Sólo se criopreservaron las muestras de individuos que mostraron una movilidad espermática mayor a 30% y una concentración espermática mayor a 10×10^6 de espermatozoides/ml.

La evaluación de los parámetros fisiológicos de movilidad, vitalidad e integridad funcional de membrana plasmática de las muestras espermáticas se realizaron antes y

después del proceso de criopreservación, la evaluación del parámetro de concentración de células espermáticas sólo se realizó antes del proceso de criopreservación.



A. Camal Municipal de Huancavelica, Provincia de Huancavelica (3800 m.s.n.m)



B. Toma de muestra seguido inmediatamente del beneficio



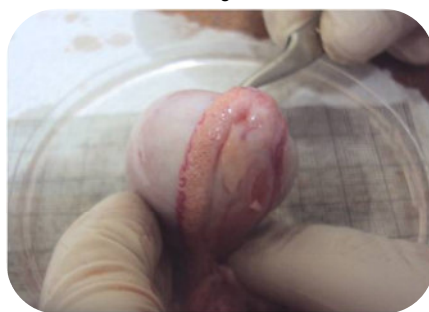
C. Extracción del par de testículos



D. Testículos seleccionados > 4cm de longitud



E. Testículo de alpaca



F. Cola del epidídimo del testículo

Figura N° 10: Colección, procesamiento y evaluación de las muestras de testículos de alpaca

Todas las evaluaciones se realizaron siguiendo el criterio descrito por la Organización Mundial de Salud (2010) con algunas modificaciones, descritas a continuación:

5.2.2.1 Evaluación de la movilidad

La movilidad espermática es evaluada antes y después del proceso de criopreservación, se toma 10 µl de la muestra espermática se coloca sobre una lámina atemperada a 37°C y se observa al microscopio óptico de campo claro a una magnificación de 400X. Se debe contar por lo menos 200 espermatozoides en diferentes campos, bajo los siguientes criterios:

MP: Movilidad progresiva

MNP: Movilidad no progresiva

IN: Inmovilidad

Donde $MP + MNP = \text{Movilidad total}$. Para este experimento los resultados se expresarán en porcentaje de movilidad total de los espermatozoides.

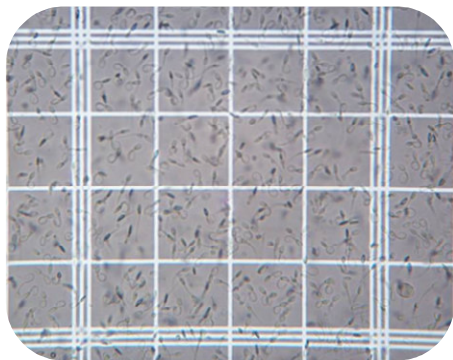


Figura N° 11: Movilidad de espermatozoides en alpaca, 400X

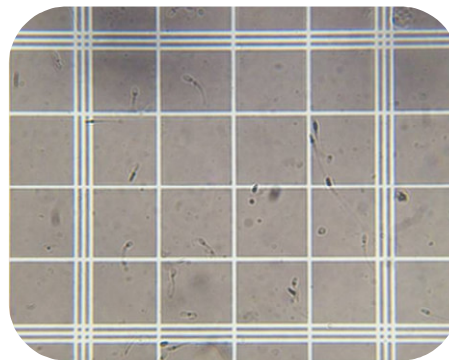
5.2.2.2 Medición de la concentración

La concentración de espermatozoides se determina usando el método del hemocitómetro, para lo cual usamos la cámara Neubauer. Para hacer el conteo, se realizó una dilución de 10 µl de muestra en 990 µl de agua destilada, luego se coloca 10 µl de esta dilución en el centro de la cámara, se deja reposar por 5 minutos y se realizará el conteo de los 5 cuadrados. Si el espermatozoide yace en la línea divisoria

de dos cuadrados grandes, éste será contado si está sobre o al lado izquierdo del cuadrado analizado. Luego el resultado final del conteo se expresó en millones de espermatozoides por ml.



A. Macho con adecuada concentración espermática



B. Macho con baja concentración espermática

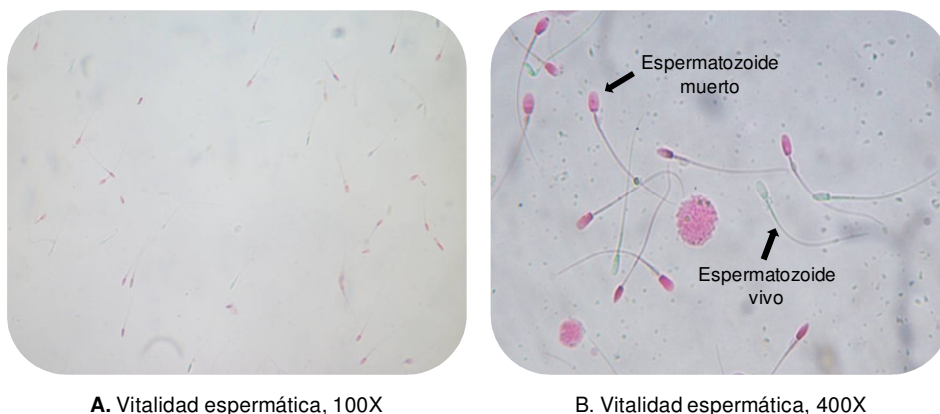
Figura N° 12: Concentración de espermatozoides en alpaca, 400X

5.2.2.3 Evaluación de la vitalidad

La vitalidad fue evaluada con el colorante vital Eosina Y al 0.5% antes y después del proceso de criopreservación. Sobre un portaobjeto atemperado a 37°C se coloca 5 µl de la muestra y luego se añade 5 µl de eosina Y (previamente atemperada a 37°C), se mezclan ambas gotas. Se coloca un cubreobjetos, se deja 30 segundos y se observa bajo el microscopio óptico (400X), se cuentan diferentes campos para la evaluación. Los resultados son expresados en porcentaje de espermatozoides vivos con respecto al total de espermatozoides evaluados. Los criterios para evaluar los espermatozoides son los siguientes:

Espermatozoides muertos: cabeza rosada

Espermatozoides vivos: cabeza blanca.



A. Vitalidad espermática, 100X

B. Vitalidad espermática, 400X

Figura N° 13: Vitalidad de espermatozoides en alpaca, eosina 0.5%

5.2.2.4 Evaluación de la Integridad funcional de membrana plasmática (test HOST)

La integridad funcional de la membrana plasmática de los espermatozoides es evaluada por el test HOST, donde los espermatozoides con membranas normales van a ser capaces de incorporar agua e hincharse a nivel de la cola. La solución hipoosmótica fue preparada con una osmolaridad final de 100 mOsm para lo cual se resuspende 20 μ l de la preparación de espermatozoides en 180 μ l de la solución hipoosmótica por 30 minutos a 37°C. Pasado el tiempo tomar 10 μ l de la muestra y colocarlo sobre una lámina para evaluar la proporción de espermatozoides que muestran el típico enrollamiento de la cola (membrana intacta), causado por el hinchamiento, con respecto del número total de espermatozoides contados. 200 espermatozoides fueron evaluados bajo el un microscopio óptico (400X). Los resultados son expresados como el porcentaje de espermatozoides con membrana integra funcional respecto al total de espermatozoides evaluados.

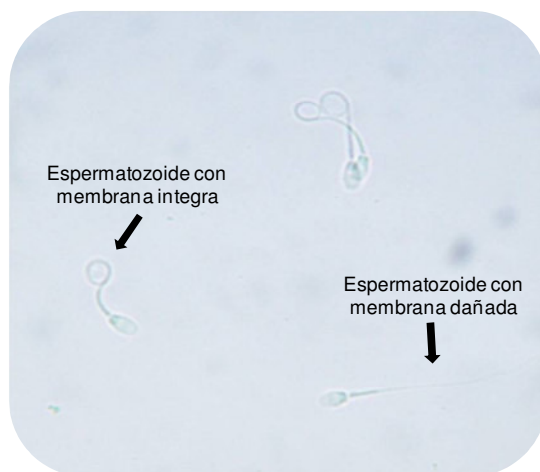


Figura N° 14: Test de integridad de membrana plasmática en espermatozoides de alpaca, 400X

5.2.2.5 Evaluación de la integridad acrosomal

Se utilizó la técnica de doble tinción descrita por Didion et al. (1989) y modificada por Santiani et al. (2005). Para lo cual se incubó 50 μ L de suspensión espermática con 50 μ L de Azul de tripán al 2% por 30 minutos y a 37°C, se realizó 2 ó 3 lavados con PBS y se centrifugó a 1800 rpm durante 5 minutos. Luego se resuspendió el precipitado con PBS y extendió 25 μ L en una lámina portaobjeto, se dejó secar a medio ambiente por 20 minutos, pasado el tiempo se sumergió la lámina en solución Giemsa al 20% por 4 horas o toda la noche, finalmente se enjuagó con agua destilada, secó a temperatura ambiente y se procedió al montaje de las láminas con Entellan para su posterior evaluación. Se observó con el objetivo de inmersión (1000X) un mínimo de 200 espermatozoides en diferentes campos ópticos, los resultados se expresaron en porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma íntegro (intacto). Los espermatozoides fueron clasificados de acuerdo a los patrones de tinción, como sigue:

- Espermatozoides vivos con acrosoma intacto: Región post ecuatorial transparente y región acrosomal fucsia
- Espermatozoides vivos con acrosoma reaccionado: Región post ecuatorial y acrosomal transparente
- Espermatozoides muertos con acrosoma intacto: Región pos ecuatorial azul oscuro y región acrosomal fucsia
- Espermatozoides muertos con acrosoma reaccionado: Región post ecuatorial azul oscuro y la región acrosomal transparente.

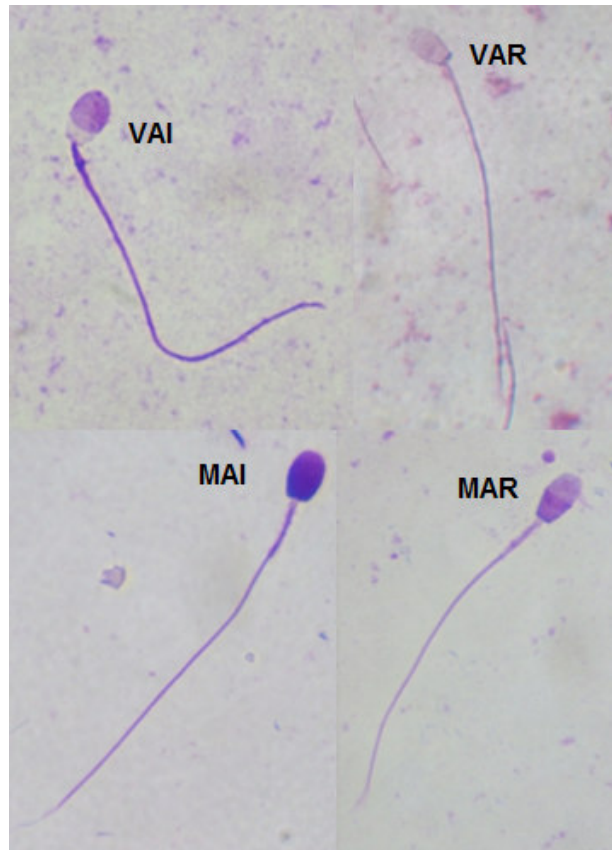


Figura N° 15: Patrones de tinción del acrosoma de espermatozoides de alpaca, con la técnica doble tinción Azul de tripán - Giemsa: espermatozoides vivos con acrosoma intacto (VAI), espermatozoides vivos con acrosoma reaccionado (VAR), espermatozoides muertos con acrosoma intacto (MAI), y espermatozoides muertos con acrosoma reaccionado (MAR), 1000X.

5.2.3 Preparación de Solución Stock L-cisteína

Para obtener las concentraciones de 2.5, 5 y 10 mM de L-cisteína, las soluciones stocks fueron preparadas como sigue: se pesó 30.29 mg, 60.58 mg y 121.16 mg de L-cisteína, luego se procedió a disolver cada una en 1 ml de agua de inyección; para obtener el stock de la solución A, B y C respectivamente, finalmente a cada 500 µl de la dilución (dilutor Tes-Tris-Yema más muestra espermática) se le agregó 0.3029 mg (5 µl de solución stock A) o 0.6058 mg (5 µl de solución stock B) o 1.2116 mg (5 µl de solución stock C) para obtener una concentración final de 2.5, 5 y 10 mM de L-cisteína. Al tratamiento control se agregó 5ul de suero fisiológico.

Se trabajó con cuatro tratamientos como sigue:

- Tratamiento control: sin suplemento de L-cisteína (Post Cn)
- Tratamiento 1: con suplemento de L-cisteína 2.5 mM. (Post T1)
- Tratamiento 2: con suplemento de L-cisteína 5 mM. (Post T2)
- Tratamiento 3: con suplemento de L-cisteína 10 mM. (Post T3)

El resumen del diseño experimental se muestra en la Figura N° 16.

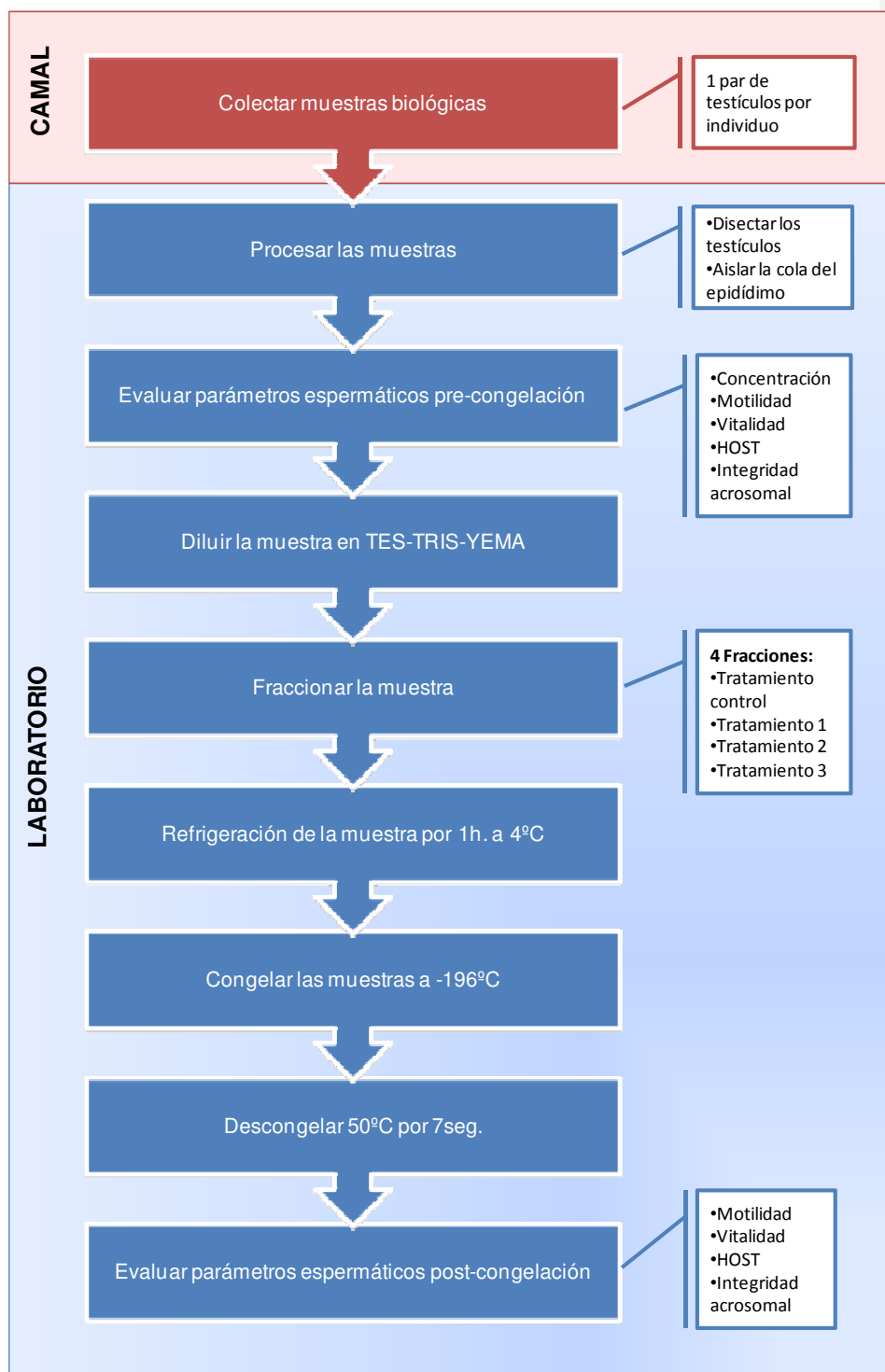


Figura N° 16: Diseño experimental de criopreservación en espermatozoides de alpaca

5.2.4 Protocolo de criopreservación

El protocolo de criopreservación usado fue el descrito por Canorio (2009), el cual usa como medio de criopreservación el medio dilutor Tes-Tris-Yema Citrato y el agente crioprotector Dimetilacetamida (DMA) a una concentración de 0.375 M, empleando el procedimiento de congelamiento lento programado. Brevemente la metodología fue la siguiente: después de la evaluación de los parámetros fisiológicos de la muestra espermática de cada individuo, dicha muestra de 1ml se dividió en cuatro alícuotas de 250 µl cada una, para los cuatro tratamientos, y se procedió a la dilución (1:1) con el dilutor, para luego ser suplementado con L-cisteína o sin L-cisteína (Grupo control) dependiendo del tratamiento.

Se cargó 150 µl de la suspensión de espermatozoides en pajillas de criopreservación de 250 µl de polyvinil cloruro y se selló con cera de sellado para hematocrito.

Todas las pajillas fueron puestas horizontalmente sobre un soporte y llevadas a 4°C por una hora para estabilizarse previo al congelamiento. Pasado el tiempo las pajillas fueron colocadas en el sistema de congelamiento termocontrolado haciendo uso del sistema CRYOBATH dirigido por el software Cryogenesis Versión 4.0 (Cryologics), siguiendo el protocolo de congelamiento descrito por Canorio (2009).

La temperatura inicial fue de 4°C, las muestras fueron mantenidas a esa temperatura por cinco minutos. El segundo periodo fue el descenso de la temperatura de 4°C a 2°C a una velocidad de 3°C/minuto, manteniendo a 2°C por un minuto, posteriormente se procedió a hacer la siembra (SEEDING), la cual consiste en el sembrado de cristales de hielo. Para ello se procedió a tocar la base de las pajillas con la punta de una pinza la cual estaba a -196°C aproximadamente hasta que se viera un ligero cambio de color en las paredes de las pajillas, lo cual indica la formación de microcristales. El tercer periodo fue desde 2°C hasta -30°C con una velocidad de congelamiento de 5°C por minuto y finalmente de -30°C a -80°C con una velocidad de congelamiento de 8°C/minuto. Finalmente las pajillas se sumergieron en nitrógeno líquido a -196°C y fueron mantenidas a esta temperatura hasta su descongelamiento y respectiva evaluación.

5.2.5 Descongelación de las muestras

Las muestras fueron descongeladas a 50°C por 7 segundos, luego las pajillas fueron cortadas por ambos extremos y el contenido colocado en microtubos nuevos, los cuales contenían medio HAM F10 libre de BSA previamente atemperado, las muestras

fueron lavadas con el mismo medio. Luego se procedió a evaluar el estado de los espermatozoides. Se realizaron evaluaciones de movilidad, viabilidad, estado de la integridad de membrana plasmática y membrana acrosomal, siguiendo la misma metodología que se usó previo al proceso de criopreservación.

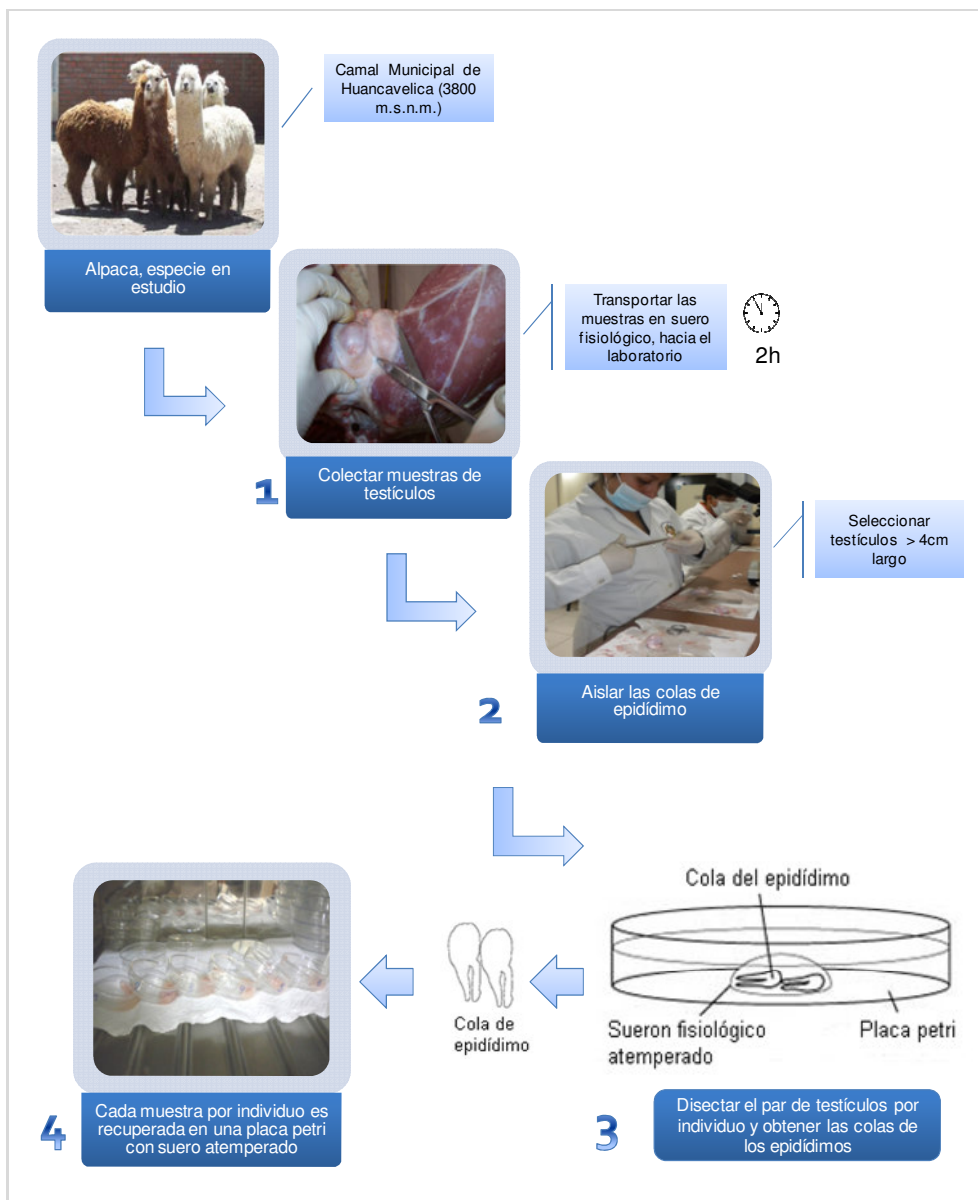


Figura N° 17: Colección y evaluación de las muestras testiculares de alpaca, pre criopreservación

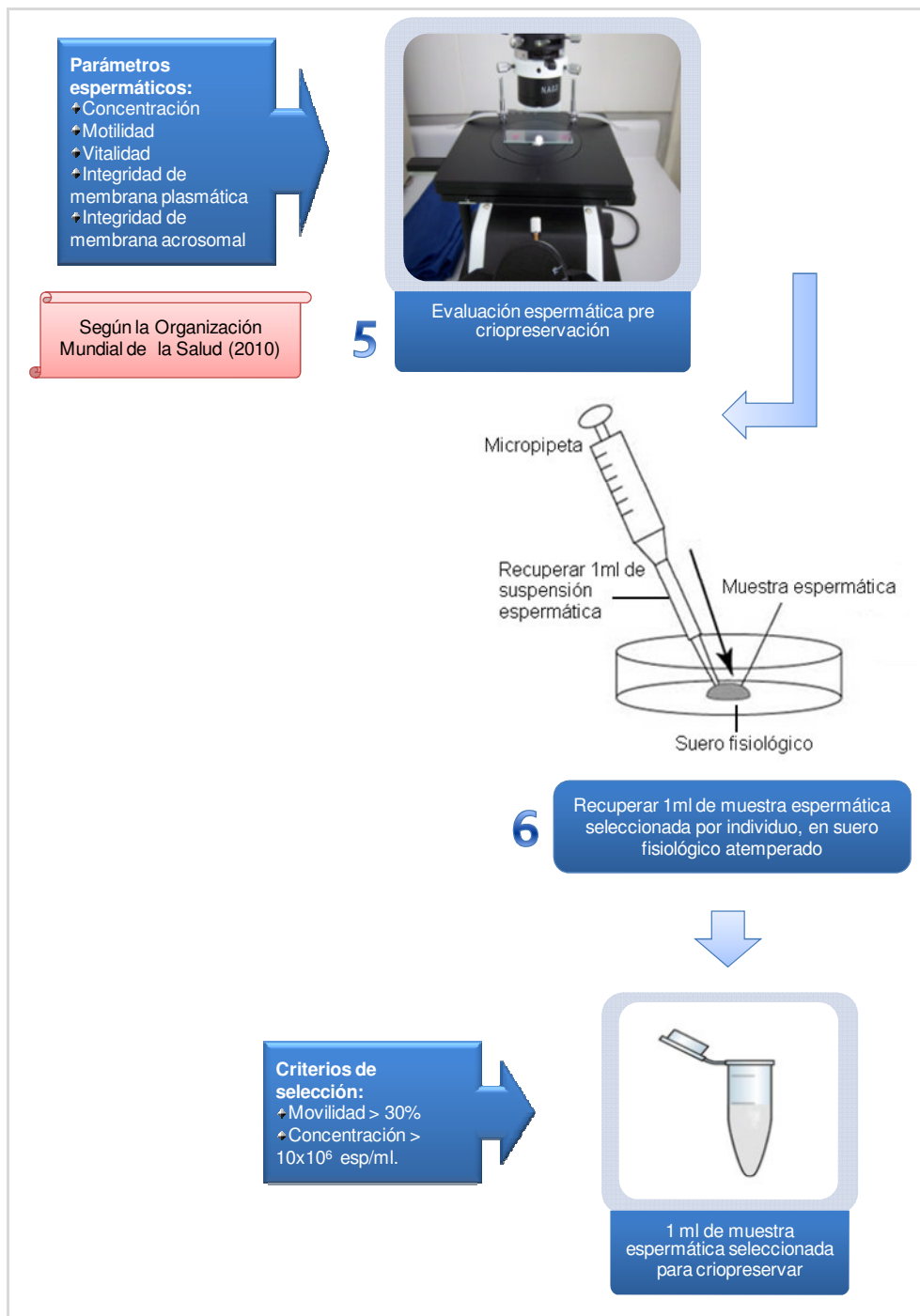


Figura N° 18: Evaluación de los parámetros espermáticos pre criopreservación

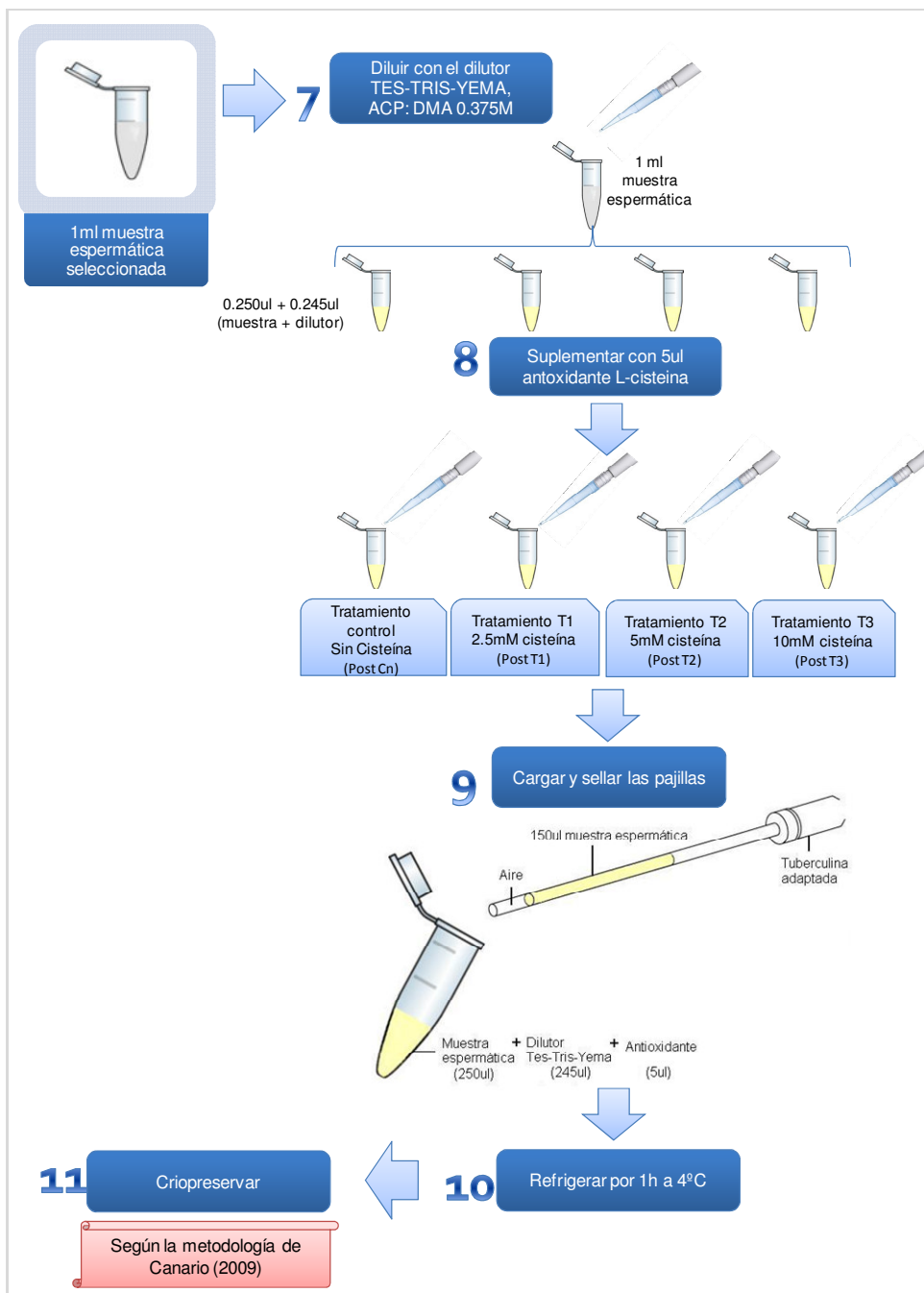


Figura N° 19: Tratamiento seguido luego de la recolección y criopreservación

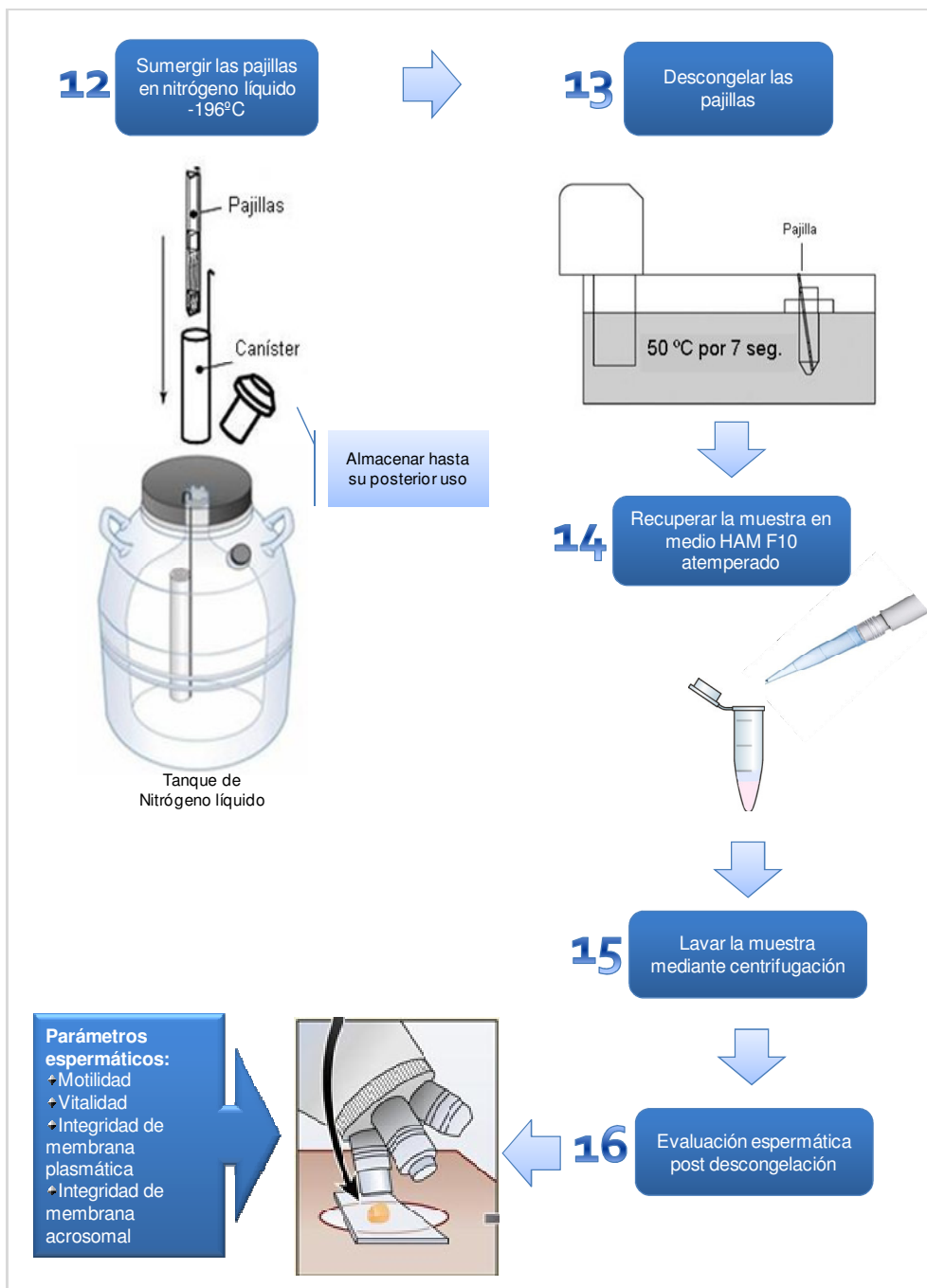


Figura N° 20: Tratamiento seguido luego de la descongelación

5.2.6 Análisis de datos

Los datos fueron analizados mediante el software estadístico SPSS (Versión 20.0). Se realizaron tres repeticiones por cada tratamiento y los resultados han sido expresados como la media \pm DE (desviación estándar). Debido a que los datos de movilidad, vitalidad, integridad de membrana plasmática e integridad acrosomal fueron expresados en porcentajes; dichos valores fueron transformados a valores angulares ($\text{ángulo} = \arccos(\sqrt{x})$, donde x es el valor decimal que representa los resultados en porcentaje) para acercar los datos a una distribución normal. Se realizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para contrastar si los datos de las variables proceden de una población con distribución normal. Luego de evidenciar que dichas variables evaluadas tienen distribución normal, el siguiente paso fue comparar las medias, mediante un análisis de varianza (ANOVA) para un diseño completamente aleatorio con la variable independiente (factor) y los tratamientos (suplementación de L-cisteína a 2.5, 5 y 10 mM y el tratamiento control sin suplementación de L-cisteína). Finalmente, los valores fueron evaluados mediante la prueba Tukey, para saber entre qué tratamientos existían diferencias significativas. Diferencias con valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativas.

6. Resultados

Los resultados obtenidos se muestran por separado para cada una de los parámetros espermáticos analizados según los tratamientos; así mismo las tablas obtenidas del análisis estadístico mediante el software SPSS V.20 se adjuntan en los anexos para mayor detalle.

A continuación se muestra la calidad espermática de alpaca post descongelación, luego de ser criopreservados con diferentes concentraciones de L-cisteína: Movilidad, vitalidad, integridad de membrana plasmática y membrana acrosomal espermática.

Se trabajó con cuatro tratamientos como sigue:

- Tratamiento control: sin suplemento de L-cisteína (Post Cn)
- Tratamiento 1: con suplemento de L-cisteína 2.5 mM. (Post T1)
- Tratamiento 2: con suplemento de L-cisteína 5 mM. (Post T2)
- Tratamiento 3: con suplemento de L-cisteína 10 mM. (Post T3)

Además de los datos pre congelación (Pre)

6.1 Efecto del antioxidante L-Cysteina sobre la calidad espermática post descongelación

6.1.1 Movilidad espermática post descongelación

En general se observó una reducción de la movilidad progresiva luego del proceso de congelación - descongelación, se encontró diferencias significativas entre la media de los datos pre congelación (52.66 ± 7.50 %) comparado con las medias de los datos post descongelación. Además, se evidencia el efecto de la L-cisteína en el dilutor Tes-Tris-Yema sobre la movilidad progresiva después de la descongelación de espermatozoides de alpaca; es así que se observó mayor movilidad progresiva espermática en el tratamiento T1 que contiene 2.5 mM de L-cisteína (26.79 ± 4.28 %) en comparación con el tratamiento control 0 mM (22.67 ± 4.28 %), tratamiento T2 que contiene 5 mM (22.03 ± 1.86 %) y tratamiento T3 que contiene 10 mM (15.71 ± 2.03 %) de L-cisteína; ($p < 0,05$).

El análisis estadístico post hoc HSD de Tukey identificó cuatro subconjuntos homogéneos, es decir existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, como se observa en la figura N° 21. A pesar de ello, el tratamiento Post Cn no muestra diferencias significativas con los tratamientos Post T1 y Post T2 respectivamente, pero si existen diferencias significativas ente los tratamientos Post T1 y Post T2.

De los datos mostrados se observa una disminución de la movilidad progresiva espermática post descongelación cuando mayor es la concentración de L-cisteína.

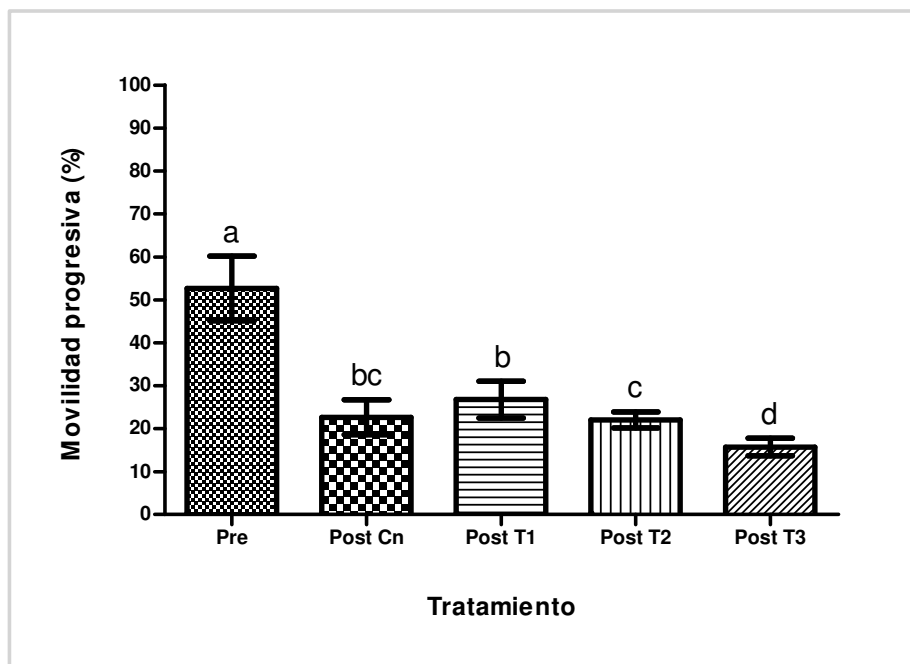


Figura N° 21: Efecto de L-cisteína sobre la movilidad progresiva espermática post descongelación

Muestras frescas: Pre (Pre congelación); muestras post descongelación a diferentes concentraciones de L-cisteína: Post Cn (control 0 mM), Post T1 (2.5 mM), Post T2 (5 mM) y Post T3 (10 mM); los datos son presentados como barras (media ± DE, n = 16). Diferentes letras en la parte superior de las barras indican diferencias significativas entre tratamientos (p < 0,05).

6.1.2 Vitalidad espermática post descongelación

Los tratamientos post descongelación mostraron una disminución significativa de la viabilidad espermática luego del proceso de criopreservación en comparación con la media de los datos pre Congelación (66.43 ± 10.20 %). A pesar de ello, la suplementación de L-cisteína en el dilutor Tes-Tris-Yema afectó la vitalidad después de la descongelación de espermatozoides de alpaca; se observó mayor vitalidad espermática en el tratamiento T1 que contiene 2.5 mM de L-cisteína (26.50 ± 4.67 %), en comparación con el tratamiento control 0 mM (21.25 ± 3.74 %), tratamiento T2 que

contiene 5 mM (22.37 ± 3.52 %) y tratamiento T3 que contiene 10 mM (219.76 ± 3.64 %) de L-cisteína; ($p < 0,05$).

El análisis estadístico post hoc HSD de Tukey mostró que existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, se identificó tres subconjuntos homogéneos, como se observa en la figura N° 22. El tratamiento Post Cn, Post T1 y Post T2 no presentan diferencias significativas, del mismo modo los tratamientos Post Cn, Post T2 y Post T3 tampoco presentan diferencias significativas; sin embargo los tratamientos Post T1 y Post T3 si muestran diferencias significativas, es decir la comparación de sus medias difieren entre si.

De los datos mostrados se observa una disminución de la vitalidad espermática post descongelación cuando mayor es la concentración de L-cisteína.

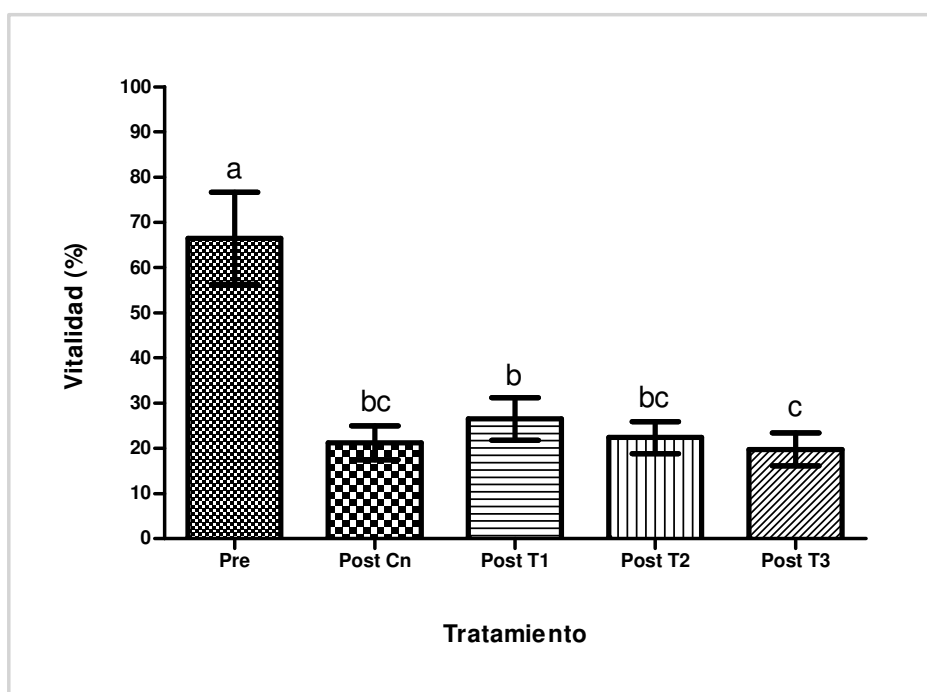


Figura N° 22: Efecto de L-cisteína sobre la vitalidad espermática post descongelación

Pre (Pre congelación); muestras post descongelación a diferentes concentraciones de L-cisteína: Post Cn (control 0 mM), Post T1 (2.5 mM), Post T2 (5 mM) y Post T3 (10 mM); los datos son presentados como barras (media \pm DE, $n = 16$). Diferentes letras en la parte superior de las barras indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

6.1.3 Integridad de la membrana plasmática espermática post descongelación

La integridad de la membrana plasmática estructural y funcional del espermatozoide, es esencial para el proceso de fertilización y su evaluación es de particular importancia. Además, el proceso de capacitación espermática, reacción del acrosoma y la penetración de ovocitos requiere un plasmalema bioquímicamente activa.

Se detectó una reducción de la integridad de membrana acrosomal luego del proceso de criopreservación, por lo que se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos pre congelación ($70.72 \pm 9.30 \%$) y post descongelación. A pesar de verificarse una disminución en el parámetro de integridad de membrana acrosomal, se pudo observar el efecto de la suplementación de L-cisteína en el dilutor Tes-Tris-Yema después de la descongelación de espermatozoides de alpaca. Se registró mejores resultados en el tratamiento T1 que contiene 2.5 mM de L-cisteína ($38.12 \pm 5.32 \%$); en comparación con el tratamiento control 0 mM ($30.09 \pm 5.08 \%$), tratamiento T2 que contiene 5 mM ($32.13 \pm 3.76 \%$) y tratamiento T3 que contiene 10 mM ($29.42 \pm 3.65 \%$) de L-cisteína; ($p < 0.05$).

El análisis estadístico post hoc HSD de Tukey identificó tres subconjuntos homogéneos, es decir existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. Los tratamientos Post Cn, Post T2 y Post T3 no muestran diferencias significativas, es decir los tres tratamientos son homogéneos, cuyas medias no se diferencian entre sí.

De los datos mostrados se observa una disminución de la movilidad progresiva espermática post descongelación cuando mayor es la concentración de L-cisteína.

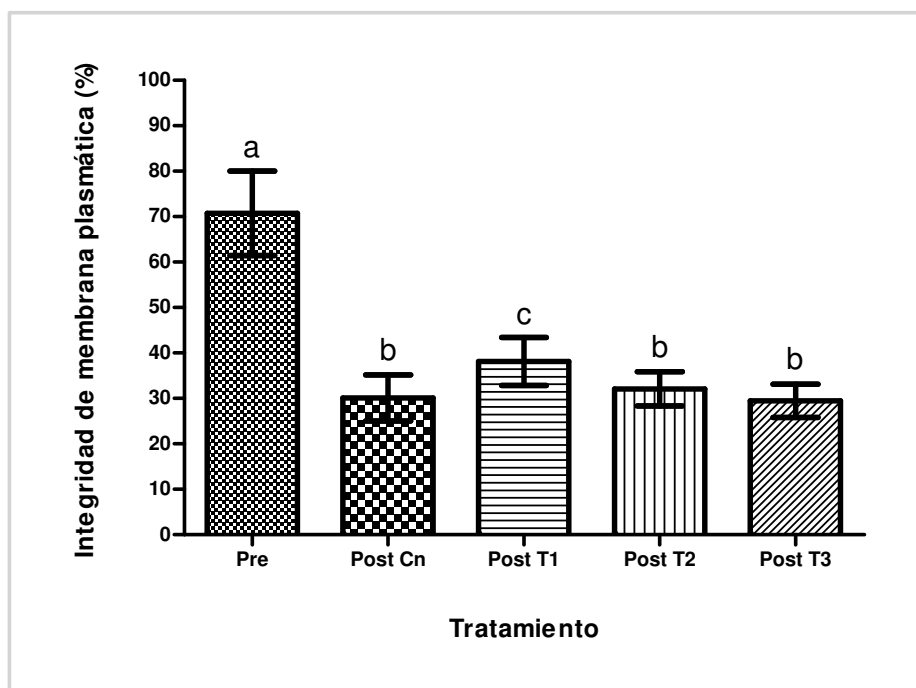


Figura N° 23: Efecto de L-cisteína sobre la integridad de membrana plasmática espermática post descongelación.

Muestras frescas: Pre (Pre congelación); muestras post descongelación a diferentes concentraciones de L-cisteína: Post Cn (control 0 mM), Post T1 (2.5 mM), Post T2 (5 mM) y Post T3 (10 mM); los datos son presentados como barras (media \pm DE, $n = 16$). Diferentes letras en la parte superior de las barras indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

6.1.4 Integridad de la membrana acrosomal espermática post descongelación

Los datos sobre el efecto de la suplementación de L-cisteína en el dilutor Tes-Tris-Yema sobre la integridad de membrana acrosomal después de la descongelación de espermatozoides de alpaca se grafica en la figura N° 24. Los tratamientos post descongelación mostraron una disminución significativa de la integridad de membrana acrosomal luego del proceso de criopreservación en comparación con la media de los datos pre Congelación (77.48 ± 4.44 %). Se observó mejores resultados con el tratamiento T1 que contiene 2.5 mM de L-cisteína (48.18 ± 10.01 %); en comparación con el tratamiento control que contienen 0 mM (39.37 ± 8.39 %), tratamiento T2 que contiene 5 mM (34.99 ± 12.43 %) y tratamiento T3 que contiene 10 mM (24.20 ± 7.0 %) de L-cisteína; ($p < 0,05$).

El análisis estadístico post hoc HSD de Tukey identificó claramente cuatro subconjuntos homogéneos, es decir existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. A pesar de ello, los tratamientos Post Cn y Post T2 no muestran diferencias significativas, pero si existen diferencias significativas al compararlos con los demás tratamientos Post T1 y Post T3.

De los datos mostrados se observa una disminución de la integridad de membrana acrosomal espermática post descongelación cuando mayor es la concentración de L-cisteína.

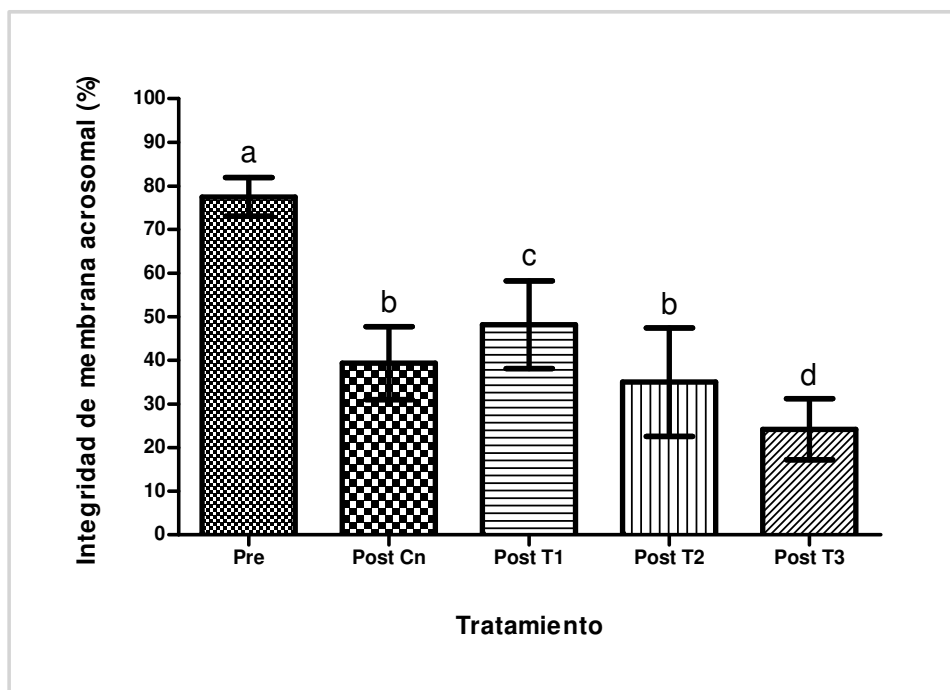


Figura N° 24: Efecto de L-cisteína sobre la integridad de membrana acrosomal espermática post descongelación

Muestras frescas: Pre (Pre congelación); muestras post descongelación a diferentes concentraciones de L-cisteína: Post Cn (control 0 mM), Post T1 (2.5 mM), Post T2 (5 mM) y Post T3 (10 mM); los datos son presentados como barras (media \pm DE, n = 16). Diferentes letras en la parte superior de las barras indican diferencias significativas entre tratamientos (p < 0,05).

7. DISCUSIÓN

El presente estudio se realizó con el objetivo de evaluar el efecto de la adición de diferentes concentraciones de L-cisteína al dilutor, sobre la movilidad, vitalidad, integridad de membrana plasmática y acrosomal frente al choque térmico y daño oxidativo causado durante el proceso congelación-descongelación en espermatozoides de alpaca.

Se ha evidenciado que los procesos de dilución, enfriamiento, congelación y descongelación, durante la criopreservación, aumentan la producción de EROs y el daño oxidativo de la membrana plasmática del espermatozoide, que a su vez daña la estructura y función de los espermatozoides (de Lamirande y Gagnon, 1992; Chanapiwat *et al.*, 2010). Por otra parte, está bien documentado que la movilidad, la integridad de membrana plasmática y acrosomal, así como la integridad del ADN de los espermatozoides de cualquier especie animal, se ven afectados negativamente después del proceso de criopreservación. Además, se ha demostrado que dichos parámetros espermáticos y la fertilidad se correlacionan negativamente con los niveles de peroxidación lipídica (Kasimanickam *et al.*, 2007). Este hecho, se debe a que la composición lipídica de la membrana plasmática de espermatozoides de mamíferos es marcadamente diferente al de las células somáticas, los espermatozoides mamíferos contienen una alta proporción de ácidos grasos poliinsaturados en la membrana plasmática (Uysal y Bucak, 2007). Por otro lado los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares, son uno de los principales sustratos moleculares con lo que reaccionan las EROs, sustrayendo electrones para lograr su estabilidad (Beckman y Ames, 1998), esta característica hace a los espermatozoides muy susceptibles al daño causado por la producción excesiva de EROs durante los procesos de congelación y descongelación, a través de una posterior peroxidación lipídica de los mismos; trayendo como consecuencia final la pérdida de la función de los espermatozoides (Uysal y Bucak, 2007).

El proceso de ataque oxidativo a los lípidos, comienza cuando un radical libre ataca a un carbono de la cadena alifática de un ácido graso y arranca un átomo de hidrógeno, formando un radical alquílico. Esta reacción se produce preferentemente en los carbonos contiguos a enlaces dobles de los ácidos grasos poliinsaturados y se propaga la reacción en cadena (Halliwell, 1997). Cuando se produce este proceso, los ácidos grasos que son esenciales para dar a la membrana la fluidez que necesita, se pierden y la permeabilidad se altera, lo que puede conducir a la célula a un proceso de muerte celular (Batellier *et al.*, 2001). Una alta

peroxidación lipídica produce: disminución de la movilidad (Donogue y Donogue, 1997), alteración de la capacidad fecundante del espermatozoide (Aurich et al., 1997), inhibición de la respiración, pérdida de enzimas intracelulares y daño estructural de la membrana, particularmente en la región del acrosoma (Aitken, 1995), también se le ha relacionado con la producción de daños en el ADN espermático (Baumber et al., 2003).

No obstante, pequeñas cantidades de EROs son esenciales para la reacción fisiológica de los espermatozoides, tales como la capacitación, reacción del acrosoma y la fertilización (Burnaugh et al., 2007). Naturalmente, los espermatozoides están equipados con un sistema defensivo que comprende antioxidantes enzimáticos (catalasa, glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa) y no enzimáticos (vitamina C, vitamina E, glutatión, cisteína) que protegen al espermatozoide de las EROs (Bilodeau et al., 2000; 2001; Andrabi, 2009). A pesar de ello, se observa que el sistema antioxidante endógeno es insuficiente para proteger a los espermatozoides del estrés oxidativo durante la dilución, equilibrio, congelación y descongelación. Se podría pensar que por tratarse de espermatozoides del epidídimo, y al no haber estado expuestos a los antioxidantes del plasma seminal, podrían acusar más este problema (Chen et al., 2003), sin embargo estudios previos demostraron que la suplementación del medio dilutor con plasma seminal no evidencia un efecto protector por parte del plasma seminal durante el proceso de criopreservación en alpaca (Rodríguez, 2009). Bilodeau et al. (2000) informó que el nivel de antioxidantes tales como el glutatión y superóxido dismutasa disminuyen en un 78 % y 50 % en el proceso de dilución, equilibrado, congelación y descongelación de semen bovino; por esta razón la adición de antioxidantes a los medios de incubación con el fin de evitar el estrés oxidativo, ha sido utilizada para proteger la estructura y funcionalidad espermática durante la congelación - descongelación de espermatozoides (Chi et al., 2008).

En los últimos años numerosas investigaciones han sugerido la suplementación del medio dilutor con antioxidantes, de tipo enzimático y no enzimático o la combinación de ambos; con el propósito de prevenir y minimizar los daños causados por las EROs, principalmente mantener la integridad de membranas, preservar la movilidad espermática e integridad de ADN. La adición de antioxidantes como la cisteína al dilutor de congelación de espermatozoides, puede impedir el daño criogénico, es así que, la cisteína ha sido uno de los aditivos agregados al dilutor de congelación para mejorar los parámetros espermáticos post descongelación en diferentes especies de animales.

De esta manera los tioles son parte de una gran clase de antioxidantes esenciales para la función de las proteínas, tales como el glutatión, cisteína y tioglicol son tioles que protegen a los espermatozoides del estrés oxidativo durante la criopreservación, inducida artificialmente por el peróxido de hidrógeno (Bilodeau *et al.*, 2001, Ansari *et al.*, 2010; 2011;). Cisteína y actúa como un protector de la membrana celular a través del mantenimiento de grupos sulfhídrico (-SH), también se sabe que puede neutralizar indirectamente los radicales libres y/o actuar a través de la vía del glutatión en la célula. La criopreservación ha reportado la disminución del nivel de tioles en semen bovino (Bilodeau *et al.*, 2000). Por lo tanto, los antioxidantes son cruciales para mantener el equilibrio de las funciones celulares, es así que, la administración de suplementos de glutatión y cisteína en diluyente de congelación espermática ha resultado en una mejor calidad de espermatozoides después de la descongelación en comparación con el uso de diluyentes sin ninguna suplementación (Bilodeau *et al.*, 2001; Tuncer *et al.*, 2010).

En esta investigación se ha demostrado claramente, que la suplementación del dilutor con L-cisteína tiene un efecto, dependiente de la dosis, sobre las células espermáticas de alpaca sometidas al proceso de congelación-descongelación.

Se observa en los resultados post descongelación que la adición de L-cisteína a bajas concentraciones en el dilutor Tes-Tris-Yema, produce resultados una tendencia de efecto positivo sobre los parámetros espermáticos de movilidad, vitalidad, integridad de membrana plasmática y acrosomal; dicha tendencia positiva mostró diferencias estadísticamente significativas y por consiguiente un efecto crioprotector en los parámetros de movilidad, vitalidad e integridad de membrana plasmática en comparación con el grupo control y los demás grupos tratamiento post descongelación, a una concentración de 2.50 mM. Así mismo, observamos que la adición de altas concentración de L-cisteína al dilutor, produce resultados con una tendencia de efecto negativo sobre los parámetros espermáticos, la adición de L-cisteína a una concentración de 10 mM muestra diferencias estadísticamente significativas y por consiguiente un efecto dañino a las células espermáticas post descongelación en los parámetros de movilidad e integridad de membrana acrosomal en comparación con el grupo control y los otros grupos tratamiento.

Además de lo antes mencionado, no se ha encontrado diferencias significativas entre el grupo control sin L-cisteína y el tratamiento T2 con 5mM de L-cisteína para todos los parámetros espermáticos, probablemente porque los espermatozoides tienen la limitación en absorción de L-cisteína, como se muestra en un estudio sobre la

administración de suplementos de DHA (aceite de FSH) en el diluyente de congelación para la criopreservación de semen de jabalí y de L-cisteína en el semen de porcino (Funahashi y Sano, 2005). Por lo tanto adicionar altas concentraciones de L-cisteína puede ser desventajoso. En consecuencia, el exceso de las EROs se considera dañino principalmente al sistema mitocondrial (Kadirvel *et al.*, 2009), y por esta razón la movilidad fue uno de los parámetros espermáticos más afectado.

La mejora en los parámetros espermáticos post descongelación de alpaca encontrados en el presente estudio, podrían explicarse porque la L- cisteína es un precursor del glutatión intracelular (GSH), el cual es un cofactor en importantes antioxidantes enzimáticos, como lo son el glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, los cuales protegen los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos del estrés oxidativo espermático, mediante la reducción de la peroxidación lipídica el cual produce radicales libres como los peróxidos de hidrógeno (Bilodeau *et al.*, 2001). Previos estudios también han indicado que la adición de cisteína haría aumentar la actividad de algunas enzimas antioxidantes como la catalasa en ovejas (Bucak *et al.*, 2008), los peróxidos de glutatión y superóxido dismutasa en espermatozoides post descongelación en toro (Tuncer *et al.*, 2010). Además de las propiedades antes mencionadas, L-cisteína tiene la capacidad de atravesar las células rápidamente, y ser transformado en taurina, que , combinado con un ácido graso en la membrana plasmática, se transforma en acil-taurina, el cual puede mejorar las propiedades de agente tensioactivo y la osmorregulación de la membrana espermática (Esteves, *et al.*, 2007); estos resultados, evidencian que L-cisteína actúa como estabilizador de la membrana e inhibidor de la capacitación espermática (Johnson *et al.*, 2000).

Los resultados del presente estudio están de acuerdo con previos estudios los cuales reportan que la adición de L-cisteína al dilutor para la criopreservación de espermatozoides en otras especies de animales ha dado buenos resultados; por ejemplo, en porcino, se ha reportado que la suplementación de L-cisteína en el dilutor de congelación a una concentración de 5 mM o 10 mM podría mejorar las cualidades espermáticas post descongelación (Kaeoket *et al.*, 2010), la suplementación de L- cisteína podría mejorar la movilidad progresiva post descongelación en semen de toro (Bilodeau *et al.*, 2001), mejorar la calidad de semen canino congelado (Michael *et al.*, 2007), gato (Thuwanut *et al.*, 2008) y oveja (Uysal y Bucak *et al.*, 2007). Sin embargo, la susceptibilidad de los espermatozoides a la peroxidación de lípidos difieren entre especies y las dosis de L-cisteína usada para suplementar el dilutor también difiere, como se aprecia en los resultados mostrados en la tabla N° 07.

A pesar de ello, los intentos por criopreservar espermatozoides de alpaca han sido hasta la fecha poco satisfactorios, debido a las características propias del semen, como lo es su alta viscosidad. Asimismo, se debe considerar la baja concentración y movilidad espermática; y el alto índice de espermatozoides con morfología anormal; características usuales en alpaca. En adición, la falta de una adecuada técnica de colección, pocas investigaciones sobre la composición y uso de dilutores, etc. En general, todos estos factores incrementan la dificultad de obtener parámetros espermáticos post descongelamiento adecuados que permitan una fecundación exitosa.

Los bajos índices obtenidos dentro de los parámetros espermáticos post descongelamiento podrían explicarse también, por la mayor sensibilidad que tienen los espermatozoides de alpaca debido a la presencia de altos contenidos de fosfolípidos poliinsaturados presentes en la membrana espermática (Sansone *et al.*, 2000), los cuales lo haría más susceptible al estrés oxidativo causado durante el proceso de criopreservación.

En atención a lo antes mencionado, los resultados post descongelación que hasta el momento se han obtenido usando diferentes dilutores, agentes crioprotectores, métodos de colección de semen o epidídimo, métodos de criopreservación de espermatozoides de alpaca, no han sido muy alentadores. No obstante, con la suplementación de antioxidantes se han observado mejores resultados en comparación con los tratamientos control.

Esta investigación es la primera evaluación del efecto de la suplementación de L-cisteína en el dilutor de criopreservación en alpaca. Sin embargo, se han realizado investigaciones previas que evalúan la suplementación de otros antioxidantes al medio dilutor como son alfa tocoferol (Mancisidor, 2013) y análogos de peróxido dismutasa, Tempo y Tempol (Santiani, 2013). En ambos casos se probaron diferentes concentraciones del antioxidante y se encontraron diferencias significativas entre el grupo control y los tratamientos a diferentes concentraciones del antioxidante, los resultados post descongelación muestran una mejora de los parámetros espermáticos en comparación con el grupo control, sin antioxidantes.

Previos trabajos han demostrado que los procesos de congelación y descongelación resultan en una disminución significativa del nivel de glutatión, conllevando a una reducción del potencial de fertilización de los espermatozoides descongelados; así, es posible que, aunque aumente el nivel de H_2O_2 durante la congelación y descongelación de espermatozoides, los efectos negativos sobre los parámetros

espermáticos podrían reducirse con la suplementación de L-cisteína en el dilutor de congelación, de esta manera se podría aumentar los niveles de GSH intracelulares y proporcionar un efecto protector sobre los espermatozoides de alpaca, como se evidencia en el presente trabajo.

Por lo tanto, se acepta la hipótesis que la adición de L-cisteína en el diluyente de congelación mejora los parámetros espermáticos post descongelación a una concentración de 2.5 mM; aunque los resultados obtenidos en esta investigación y en previos estudios no han superado los valores estándares de calidad espermática post descongelamiento, esto en comparación con los resultados obtenidos en otras especies domésticas, como la especie bovina y porcina, cuyos protocolos de criopreservación se encuentran estandarizados y los índices de fertilización con espermatozoides post descongelamiento son aceptables y altos.

8. CONCLUSIONES

- La suplementación de L-cisteína al dilutor tes-tris-yema tiene un efecto dependiente de la dosis sobre los espermatozoides de alpaca, sometidos al proceso de congelación-descongelación.
- La suplementación de L-cisteína a concentraciones de 2.5 mM en el dilutor proporciona un efecto crioprotector sobre los parámetros de integridad de membrana plasmática y acrosomal de espermatozoides post descongelación en alpaca, en comparación con el grupo control y los demás tratamientos.
- La suplementación de L-cisteína a concentraciones de 10 mM en el dilutor proporciona un efecto negativo sobre parámetros de movilidad, vitalidad, integridad de membrana plasmática y acrosomal espermática post-descongelación en alpaca.

9. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar estudios para evaluar el efecto de la suplementación de bajas concentraciones de L-cisteína al dilutor, ya que los resultados del presente estudio sugieren un efecto crioprotector sobre los parámetros espermáticos post descongelamiento en alpaca a dosis menores que 2.5 mM de L-cisteína.
- Por otra parte, también se recomienda la realización de estudios que midan el nivel de tioles en los espermatozoides, esto podría ayudar a comprender el mecanismo bioquímico y molecular de L-cisteína y los efectos crioprotectores en los espermatozoides de alpaca.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agarwal A., R.A. Saleh & M.A. Bedaiwy. 2003. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertility and Sterility* 79(4): 829-43.
- Aguilar M. 2012. Esquila y categorización de fibra de alpaca, manual práctico. Arequipa: desco – Programa Regional Sur.
- Aitken R. J., M. A. Baker. 2004. Oxidative stress and male reproductive biology. *Reproduction, Fertility and Development* 16(5): 581–588.
- Aitken R.J. & C. Krausz. 2001. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction* 122(4): 497-506.
- Aitken R.J., M. Paterson, H. Fisher, D.W. Buckingham & D.M. Van. 1995. Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. *Journal of Cell Science* 108: 2017-2025.
- Aitken R.J. 1989. The role of free oxygen radicals and sperm function. *International Journal of Andrology* 12(2): 95-7.
- ▲ Aller J., G. Rebuffi, K. Cancino & R. Alberio. 2003. Influencia de la criopreservación sobre la movilidad, Viabilidad y fertilidad de espermatozoides de llama (*Lama glama*). *Archivos de Zootecnia* 52: 15–23.
- Almeida J. & B.A. Ball. 2005. Effect of alpha-tocopherol and tocopherol succinate on lipid peroxidation in equine spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 87(3-4): 321-37.
- Alvarez J.G. & B.T. Storey. 1995. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development* 42(3): 334-46.
- Alvarez J.G. & B.T. Storey. 1992. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. *Journal of Androloly* 13 (3): 232-41.
- Alvarez J.G., J.C. Touchstone, L. Blasco & B.T. Storey. 1987. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *Journal of Androloly* 8 (5): 338-348.

Con formato: Inglés (Estados Unidos)

- Andrabi S. 2009. Factors affecting the quality of cryopreserved buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animal* 44(3): 552–569.
- Anghel A., S. Zamfirescu, C. Dragomir & D. Nadolu. 2010. The Effects of Antioxidants on the Cytological Parameters of Cryopreserved Buck Semen. *Romanian Biotechnological Letters* 15 (3): 26–32.
- Ansari MS., BA. Rakha, N. Ullah, SMH. Andrabi, M. Khalid & S. Akhter. 2011. Effect of L-cysteine in tris-citric egg yolk extender on post thaw quality of Nili-Ravi buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Pakistan Journal of Zoology* 43:41–47.
- Ansari M.S., B.A. Rakha, S.M.H. Andrabi, N.Ullah & S. Akhter. 2010. Cryopreservation of Sahiwal bull epididymal spermatozoa. *Pakistan Journal of Zoology* 42: 741-743.
- Askari H.A., J.H. Check, N. Peymer & A. Bollendorf. 1994. Effect of natural antioxidants tocopherol and ascorbic acids in maintenance of sperm activity during freeze-thaw process. *Archives of Andrology* 33(1): 11-5.
- Aurich J.E., U. Schonherr, H. Hoppe & C. Aurich. 1997. Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. *Theriogenology* 48:185-192.
- Banda J., S. Evangelista, L. Ruiz, R. Sandoval, C. Rodriguez, M. Valdivia & A. Santiani. 2010. Efecto de dilutores en base a tris, tes y leche descremada en la criopreservación de espermatozoides obtenidos del epidídimo de alpaca. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 21 (2): 145-153.
- Barros L. O., S. V. Silva, F. C. Almeida & G. F. Carneiro. 2013. Efeito da Adição de Glutathione Peroxidase e Cisteína Ao Diluidor de Congelação Do Sêmen Equino. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 65(2): 430–438.
- Batellier F., M. Vidament, J. Fauquant, G. Duchamp, G. Arnaud, J.M. Yvon & M. Magistrini. 2001. Advances in cooled semen technology. *Animal Reproduction Science* 68:181-190.
- Baumber J., B.A. Ball, J.J. Linfor & S.A. Meyers. 2003. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. *Journal of Androloly* 24(4): 621-8.
- Baumber J., B.A. Ball, C.G. Gravance, V. Medina & M.C. Davies-Morel. 2000. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal

- integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. *Journal of Androloly* 21(6): 895-902.
- Beckman K.B. & B.N Ames. 1998. The free radical theory of aging matures. *Physiological Reviews* 78(2): 547-58
- Beheshti R., A. Asadi, B. Eshratkhah, J.G. GhaleK & A. Ghorbani. 2011. ORIGINAL ARTICLE. *Advances in Environmental Biology* 5 (6): 1260–1263.
- Bilodeau J.F., S. Blanchette, I.C. Gagnon & M.A. Sirard. 2001. Thiols prevent H_2O_2 mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology* 56: 275–286.
- Bilodeau J.F., S. Chatterjee, M.A. Sirard & C. Gagnon. 2000. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Molecular Reproduction and Development* 55 (3): 282-8.
- Blanch Torres, Eva. "Modificación de la membrana de los espermatozoides de verraco para mejorar su supervivencia a la crioconservación". Tesis Máster Universitario en Producción Animal. Universidad Politécnica de Valencia. España, 2007.
- Bravo PW. 2002. *The Reproductive Process of South American Camelids*. Seagull Printing, Salt Lake City, Utah, USA.
- Bravo PW., V. Alarcon & RH. Bondurant. 2000. Epididymal spermatozoa characteristics and its use on artificial insemination of llamas and alpacas. Paper presented to Proc. 14th International Congress on Animal Reproduction Stockholm, Sweden.
- Bravo PW., U. Flores, J. Garnica & C. Ordoñez. 1997a. Collection of semen and artificial insemination of alpacas. *Theriogenology* 47: 619-626.
- Bravo PW., D. Flores & C. Ordonez. 1997b. Effect of repeated collection on semen characteristics of alpacas. *Biology of Reproduction* 57:520-524.
- Bravo PW., C. Ordonez & V. Alarcon. 1996. Processing and freezing of semen of alpacas and llamas. Paper presented to Proc 13th International Congress on Animal Reproduction Sydney, Australia.
- Brenes E.R., K. Madrigal, F. Pérez & K. Valladares. 2001. El Cluster de los Camélidos en Perú: Diagnóstico competitivo y recomendaciones estratégicas. Instituto centroamericano de administración de empresas.

Brown BW. 2000. A review on reproduction in South American camelids. *Animal Reproduction Science* 58: 169-195.

Con formato: Español (España - alfab. tradicional)

Bucak M.N., A. Atessahin & A. Yuce. 2008. Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze-thawing process. *Small Ruminant Research* 75: 128-134.

Burnaugh L., K. Sabeur & BA. Ball. 2007. Generation of superoxide anion by equine spermatozoa as detected by dihydroethidium. *Theriogenology* 67: 580-589.

Cabrita E. et al. 1999. The hipoosmotic swelling test performed with coulter counter: a method to assay functional integrity of sperm membrane in rainbow trout. *Animal Reproduction Science* 55(3): 279-287.

Calderón W., J. Sumar & E. Franco. 1968. Avances en la Inseminación Artificial de la Alpaca (*Lama paco*). *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 22: 19–35.

Camacho D. 2000. Valoración de la calidad de semen porcino utilizados en el test de endosmosis y el test de resistencia osmótica, Quito, Universidad Central del Ecuador, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia 24: 33-34.

Canorio Pariona, Nadia. “Criocapacitación del espermatozoide de alpaca (*Vicugna pacos*)”. Tesis Magister en Biología Molecular. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad Ciencias Biológicas. Lima, 2009.

Celeghini E.C.C. 2007. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. *Reproduction in Domestic Animals* 42(5): 479-488.

Chanapiwat P., K. Kaeoket & P. Tummaruk. 2012. Improvement of the Frozen Boar Semen Quality by Docosahexaenoic Acid (DHA) and L-Cysteine Supplementation. *African Journal of Biotechnology* 11 (15): 3697–3703.

Chanapiwat P., K. Kaeoket & P. Tummaruk. 2010. The sperm DNA damage after cryopreservation of boar semen in relation to post-thawed semen qualities, antioxidant supplementation and boars effects. *Thai Journal of Veterinary Medicine* 40(2): 187-193.

Chanapiwat P., K. Kaeoket & P. Tummaruk. 2008. L-Cysteine Supplementation Improved Qualities of Cryopreserved Boar Semen. In *Proceedings, The 15th Congress of FAVA*, 15–18.

- Chatterjee S. & C. Gagnon. 2001. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. *Molecular Reproduction and Development* 59 (4): 451-8.
- Chen H., P.H. Chow, S.K. Cheng, A.L. Cheung & L.Y. Cheng. 2003. Male genital tract antioxidant enzymes: Their source, function in the female, and ability to preserve sperm DNA integrity in the golden hamster. *Journal of Androloly* 24: 704-711.
- Chi H.J., J.H. Kim, C.S. Ryu, J.Y. Lee, J.S. Park & D.Y. Chung. 2008. Protective effect of antioxidant supplementation in sperm preparation medium against oxidative stress in human spermatozoa. *Human Reproduction* 23(5):1023-1028.
- Costa E. N. 1996. The anomalous DNA protein complex in human spermatozoa of varicocele cases. *Braz. J. Gen., Ribeirão Preto*, Vol. 19: 147. Supplement.
- Coyan K., N. Başpınar, M. N. Bucak & P. P. Akalın. 2011. Effects of Cysteine and Ergothioneine on Post-Thawed Merino Ram Sperm and Biochemical Parameters. *Cryobiology* 63 (1): 1-6.
- Davalos R. & J.L. Olazabal. 2002, Evaluacion de dos formas de collection de semen en alpacas. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 13: 98-99.
- de Lamirande E. & C. O'Flaherty. 2008. Sperm activation: role of reactive oxygen species and kinases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1784(1): 106-15.
- de Lamirande E. & C. Gagnon. 1995. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. *Human Reproduction* 1: 15-21.
- de Lamirande E. & C. Gagnon. 1993. Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidative process. *Free Radical Biology and Medicine* 14(2): 157-66.
- de Lamirande E. & C. Gagnon. 1992. Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes and II. Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. *Journal of Androloly* 13: 368-386.
- De Los Ríos E. 2006. Producción textil de fibras de camélidos sudamericanos en el área alto-andina de Bolivia, Ecuador y Perú. Organización de las Naciones Unidas para el Desarrollo Industrial (UNIDO).

Con formato: Inglés (Estados Unidos)

- Didion B., J. Dabirsky, J. Giles & C. Graves. 1989. Staining procedure to detect viability and the true acrosome reaction in spermatozoa of various species. *Gamete Research*, New York, 22: 51-57.
- Donoghue AM, Donoghue DJ. 1997. Effects of water- and lipid-soluble antioxidants on turkey sperm viability, membrane integrity, and motility during liquid storage. *Poultry Science* 76:1440-1445.
- Drevet J.R. 2006. The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: a complex story. *Molecular and Cellular Endocrinology* 250(1-2): 70-9.
- El-Sheshtawy R.I., W.S. El-Nattat, H.A. Sabra & A. H. Ali. 2012. Cryopreservation of Extended Bull Semen Using Aromated and Non-Aromated Amino Acids with Emphasis on Conception Rate. *Global Veterinaria* 9 (5): 508–511.
- El-Sheshtawy R. I., G.A. El-Sisy & W.S. El-Nattat. 2008. Use of Selected Amino Acids to Improve Buffalo Bull Semen Cryopreservation. *Global Veterinaria* 2 (4): 146–150.
- Erkkila K. et al. 1998. Nacetyl-L-cysteine inhibits apoptosis in human male germ cells in vitro. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 83(7): 2523–2531.
- Esteves SC, RK. Sharma, Jr AJ. Thomas & A. Agarwal. 2007. Evaluation of acrosomal status and sperm viability in fresh and cryopreserved specimens by the use of fluorescent of Peanut Agglutinin Lectin in conjunction with hypo-osmotic swelling test. *International Braz J Urol* 33(3): 364–374.
- Fernández - Baca S. 1993. Manipulation of reproductive functions in male and female New World camelids. *Animal Reproduction Science* 33: 307-323.
- Fernández - Baca S. 1991. Avances y perspectivas del conocimiento de los camélidos sudamericanos. *FAO* 420pp.
- Fernández - Baca S. & W. Calderón. 1965. Métodos de colección de semen de la alpaca. *Rev. IVITA – Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos*.
- Flesch F. M. & B. M. Gadella. 2000. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochimica et Biophysica Acta*, Amsterdam, 1469(3): 197-235.
- Flores P., J. Garcia-Huidobro, C. Munoz, E. Bustos-Obregon & B. Urquieta. 2002. Alpaca semen characteristics previous to a mating period. *Animal Reproduction Science* 72: 259-266.

- Fowler ME. & PW. Bravo. 1998. Reproduction, in (eds), Medicine and Surgery of South American Camelids. 2nd Edition Iowa State University Press, Iowa, USA.
- Freyre G. 2006. Experiencias de Transformación y Comercialización de la fibra de alpacas. Conferencia Internacional de Camélidos Sudamericanos. 30-31 de Marzo, Arequipa – Perú.
- Fridovich I. 1983. Superoxido radical: an exogenous toxicant. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, Palo Alto, 23: 239-257.
- Funahashi H. & T. Sano. 2005. Selected antioxidants improve the function of extend boar semen stored at 10°C. Theriogenology 63: 1605–1616.
- Galloway DB. 2000. The development of the testicles in alpacas in Australia. Proceedings of the Australian Alpaca Association Conference Canberra, Australia.
- Garnica J., R. Achata & P.W. Bravo. 1993. Physical and biochemical characteristics of alpaca semen. Animal Reproduction Science 32: 85-90.
- Gavella M. & V. Lipovac. 1992. NADH-dependent oxidoreductase (diaphorase) activity and isozyme pattern of sperm in infertile men. Archives of Andrology 28(2): 135-41.
- Gonzales H., R. Dávalos, M. Moina & E. Mellisho. 2008. Obtención y criopreservación de espermatozoides de alpacas. Scientia 10: 223-234.
- Guyton A. & J. Hall. 2000. Tratado de Fisiología Médica. 10ma edición Mc Graw-Hill – Interamericana de España, Madrid. 1280 P.
- Halliwell B. 1997. Antioxidants: The Basics-What they are and how to evaluate them. In. Antioxidants in disease mechanisms and therapy. (edited by Sies, H.) Academic Press. Toronto, pp. 4.
- Hammerstedt R. H. 1990a. Use of spin labels to evaluate effects of cold shock and osmolality on sperm. Biology of Reproduction 18: 686-696.
- Hammerstedt R. H., J. K. Graham & J. P. Nolan. 1990b. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive? Journal of Andrology 11(1): 73-88.
- Henkel R. 2005. The impact of oxidants on sperm function. Andrologia, Giessen, 37(6): 205–206.
- Hirai M., et al. 2001. Objectively measured sperm motility and sperm head morphometry in boars (*Sus scrofa*): relation to fertility and seminal plasma growth factors. Journal of Andrology, Schaumburg, 22(1): 104-110.

Con formato: Español (alfab. internacional)

Holt WV. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*. 62: 3-22.

Huanca W. & G.P. Adams. 2007. Semen Collection and Artificial Insemination in Llamas and Alpacas. Chapter in *Current Therapy in Large Animal. Theriogenology*, Youngquist R and Threlfall W. 2° Edition Saunders.Elsevier Inc. pp 869-873.

Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI). 2013. Resultados definitivos IV Censo Nacional Agropecuario 2012, Pp 63.

Irvine D.S. 1996. Glutathione as a treatment for male infertility. *Reviews of Reproduction* 1(1): 6-12.

Jeyendran RS., H.H. Van der Ven, M. Perez, B.G. Crabo & L.J.D. Zaneveld. 1984. *Journal of Reproduction and Fertility* 70: 219–228.

Con formato: Inglés (Estados Unidos)

Johnson L.A., K.F. Weitze, P. Fiser & W.M.C. Maxwell. 2000. Storage of boar semen. *Animal Reproduction Science*. 62:142-172.

Kadirvel G., S. Kumar & A. Kumaresan. 2009. Lipid peroxidation, mitochondrial membrane potential and DNA integrity of spermatozoa in relation to intracellular reactive oxygen species in liquid and frozen-thawed buffalo semen. *Animal Reproduction Science* 114(1-3):125–134.

Kaeoket K., P. Chanapiwat, P. Tummaruk & M. Techakumphu. 2010. Supplemental effect of varying L-cysteine concentrations on quality of cryopreserved boar semen. *Asian Journal of Andrology* 12: 260-265.

Kasimanickam R., V. Kasimanickam, C.D. Thatcher, R.L. Nebel & B.G. Cassell. 2007. Relationships among lipid peroxidation, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, sperm parameters, and competitive index in dairy bulls. *Theriogenology*; 67:1004 - 12.

Koppers A.J., G.N. De Iuliis, J.M. Finnie, E.A. McLaughlin & R.J. Aitken. 2008. Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 93 (8): 3199-207.

León-Velarde C.U & J. Guerrero. 2001. Improving quantity and quality of Alpaca fiber; using simulation model for breeding strategies. SAAD III: In *Proceeding Tirad International Symposium in Systems Approachs for Agriculture Development*.

- Lozano G.M., I. Bejarano, J. Espino, D. González, A. Ortiz, J.F. García, A.B. Rodríguez & Pariente J.A. (2009). Relationship between caspase activity and apoptotic markers in human sperm in response to hydrogen peroxide and progesterone. *Journal of Reproduction and Development* 55(6): 615-21.
- Mancisidor Solorzano, Isela Betzy. "Efecto del α -tocoferol durante el proceso de criopreservación en espermatozoides de alpaca (*Vicugna pacos*)". Tesis Título. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, E.A.P. Genética y Biotecnología. Lima, 2013.
- Mazzilli F., T. Rossi, L. Sabatini, F.M. Pulcinelli, S. Rapone, F. Dondero & P.P. Gazzaniga. 1995. Human sperm cryopreservation and reactive oxygen species (ROS) production. *Acta Europaea Fertilitatis* 26 (4): 145-8.
- McEvoy T.G., C.E. Kyle, d. Slater, C.I. Adams & D.A. Bourke. 1992. Collection, evaluation and cryopreservation of llama semen. *Journal Reproduction and Fertility* 9 (81) (Abstract).
- McLeod J. 1943. The role of oxygen in the metabolism and motility of human spermatozoa. *American Journal of Physiology* 138 (3): 512-8.
- Meister A. 1994. Glutathione, ascorbate, and cellular protection. *Suplement Cancer Research*, Philadelphia, 54: 1969-1975.
- Michael A., C. Alexopoulos, E. Pontiki, D. Hadjipavlou-Litina, P. Saratsis & C. Boscos. 2007. Effect of antioxidant supplementation on semen quality and reactive oxygen species of frozen-thawed canine spermatozoa. *Theriogenology* 68 (2): 204-12.
- Mogrovejo D. "Estudios del semen de la alpaca". BS Tesis, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima Perú, 1952.
- Morton KM., G. Evans, & W.M.C. Maxwell. 2010. Effect of glycerol concentration, Equex STM® supplementation and liquid storage prior to freezing on the survival and functional integrity of frozen-thawed epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm. *Theriogenology* 74: 311–316
- Morton KM, R. Vaughan, JL. & W.M.C. Maxwell. 2008. Continued Development of Artificial Insemination Technology in Alpacas. Rural Industries Research and Development Corporation-RIRDC publication N°08/057.
- Morton KM, R. Bathgate, G. Evans & W.M.C. Maxwell. 2007. Cryopreservation of epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm: a comparison of Citrate, Tris and

Con formato: Inglés (Estados Unidos)

- Lactose based diluents, and pellets and straws. *Reproduction, Fertility and Development* 19:792-96.
- Nogushi N. & E. Niki. 1999. Chemistry of active oxygen species and antioxidants. In. *Antioxidant status, Diet, Nutrition, and Health* (edited by Papas, A.M.) CRC Press. Washington, D.C., pp. 3-19.
- Novoa C., E. Franco; W. García; D.Pezo. 1999. Dosis de Gonadotropinas (eCG y hCG), superovulación y obtención de embriones en alpacas. *RIVEP. Perú* 10 (1):48-53.
- Pacheco C. "Efecto de la tripsina y colagenasa sobre el acrosoma espermatozoide y su relación con la fertilidad del semen de alpaca". Tesis título profesional de Médico Veterinario Zootecnista. Universidad Católica Santa María, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Arequipa, 1996.
- Papas A.M. 1999. Determinants of antioxidant status in humans. In. *Antioxidant status, Diet, Nutrition, and Health* (edited by Papas, A.M.) CRC Press. Washington, D.C., pp. 24-30.
- Peña F.J., A. Johannisson, M. Wallgren & H. Rodriguez. 2003. Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. *Animal Reproduction Science* 78(1-2): 85-98.
- Perez M.G. 2005. Perspectivas de la inseminación artificial en camelidos sudamericanos. Universidad Nacional del Altiplano, Puno-Perú.
- Petrunkina A. M., et al. 2001. Sperm-cell volumetric measurements as parameters in bull semen function evaluation: correlation with nonreturn rate. *Andrologia, Giessen* 33(6): 360-367.
- Pumayalla A. & C. Leyva. 1988. Production and technology of the alpaca and vicuña fleece. *Proceedings of the 1st. international symposium on speciality fibres, DWI, Aachen*, pp. 234 -241.
- Pursel V. & L. Johnson. 1987. Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *J. Animal Sci*, pp. 99-112.
- Raymundo F., W. Huanca, S. Huertas & M. Gauly. 2000. Influence of different extenders on the motility in alpaca (*Lama pacos*) semen. *Proceedings of the 2nd Int Camelid Conference Agroecconomics of Camelid Farming Almaty, Kazakhstan*.

- Rodríguez Llano, Claudia Violeta. "Efecto del plasma seminal sobre la supervivencia de espermatozoides criopreservados de alpaca (*Vicugna pacos*)". Tesis Magister en Producción y Reproducción Animal. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria. Lima, 2009.
- Rota A., et al. 2000. Hypoosmotic swelling (HOS) as a screening assay for testing in vitro fertility of bovine spermatozoa. *Theriogenology*, Amsterdam, 53(7): 1415-1420.
- Roy S.C. & S.K. Atreja. 2007. Effect of reactive oxygen species on capacitation and associated protein tyrosine phosphorylation in buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 107(1-2): 68-84.
- Saleh R.A. & A. Agarwal. 2002. Oxidative stress and male infertility: From research bench to clinical practice. *Journal of Andrology* 23:737-749.
- San Martín M. 1961. Fisiología de la reproducción de la alpaca, Anim. Symp. Sobre problemas ganaderos. Lima Perú, pp 121- 131.
- Sansone G., M.J.F. Natri & A. Fabbrocini. 2000. Storage of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. *Animal Reproduction Science* 62: 55-76.
- Santiani A., S. Evangelista, M. Valdivia, J. Risopatrón & R. Sanchez. 2013. Effect of the addition of two superoxide dismutase analogues (Tempo and Tempol) to alpaca semen extender for cryopreservation. *Theriogenology* 79(5): 842–846
- Santiani A., W. Huanca, R. Sapana, T. Huanca, N. Sepúlveda & R. Sánchez. 2005. Effects on the quality of frozen-thawed alpaca (*Lama pacos*) semen using two different cryoprotectants and extenders. *Asian Journal of Andrology* 7(3): 303-309.
- Satorre M.M., E. Breininger, M.T. Beconi & N.B. Beorlegui. 2007. α -Tocopherol modifies tyrosine phosphorylation and capacitation-like state of cryopreserved porcine sperm. *Theriogenology* 68 (7): 958-65.
- Sikka S.C. 2001. Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. *Current Medicinal Chemistry* 8(7): 851-62.
- Sikka S.C., M. Rajasekaran & W.J. Hellstrom. 1995. Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. *Journal of Andrology* 16: 464-468.
- Silva P.F.N. 2006. Physiology of peroxidation process in mammalian sperm. PhD Thesis. Utrech University, Ridderprint, Ridderkerk :5-36.
- Smith BB. 1999. Overview of reproduction in the male llama and alpaca. *Proceedings of the Society for Theriogenology* :191-196.

Con formato: Inglés (Estados Unidos)

- Smith CL., A.T. Peter & D.G. Pugh. 1994. Reproduction in llamas and alpacas: a review. *Theriogenology* 41: 573-592.
- Storey B.T. 1997. Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa. *Molecular Human Reproduction* 3(3): 203-13.
- Suleiman S.A., M.E. Ali, Z.M. Zaki, E.M. el-Malik & M.A. Nasr. 1996. Lipid peroxidation and human sperm motility: protective role of vitamin E. *Journal of Andrology* 17(5): 530-7.
- Sumar J. 1983. Studies on reproductive pathology in alpacas. Faculty of Veterinary Medicine Uppsala, Sweden, University of Agricultural Sciences: 90.
- Szczesniak-Fabianczyk B., M. Bochenek, Z. Smorag & M.A. Silvestre. 2003. Effects of antioxidants added to boar semen extender on the semen survival and sperm chromatin structure. *Reproductive Biology* 3:81-87.
- Thérond P., J. Auger, A. Legrand & P. Jouannet. 1996. Alpha-Tocopherol in human spermatozoa and seminal plasma: relationships with motility, antioxidant enzymes and leukocytes. *Molecular Human Reproduction* 2 (10): 739-44.
- Thuwanut P., K. Chatdarong, M. Techakumphu & E. Axner. 2008. The effect of antioxidants on motility, viability, acrosome integrity and DNA integrity of frozen-thawed epididymal cat spermatozoa. *Theriogenology* 70: 233-240.
- Tibary A. & M.A. Memon. 1999. Reproduction in the male South American Camelidae. *Journal of Camel Practice and Research* 6(2): 235-248.
- Topraggaleh T. R., A. Shahverdi, A. Rastegarnia, B. Ebrahimi, V. Shafiepour, M. Sharbatoghli, V. Esmaeili & E. Janzamin. 2013. Effect of Cysteine and Glutamine Added to Extender on Post-Thaw Sperm Functional Parameters of Buffalo Bull. *Andrologia* : 1–7.
- Tselkas K., P. Saratsis, A. Karagianidis & S. Samouilidis. 2000. Extracellular presence of reactive oxygen species (ROS) in fresh and frozen-thawed canine semen and their effects on some semen parameters. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 107 (2), 69-72.
- Tuncer PB., MN. Bucak, et al. 2010. The effect of cysteine and glutathione on sperm and oxidative stress parameters of post-thawed bull semen. *Cryobiology* 61:303–307.

- Uysal O. & M.N. Bucak. 2007. Effects of Oxidized Glutathione, Bovine Serum Albumin, Cysteine and Lycopene on the Quality of Frozen-Thawed Ram Semen. *Acta Veterinaria Brno* 76(3): 383-390.
- Valdivia M., M. Ruíz, L. Bermudez, S. Quinteros, A. Gonzáles, I. Manosalva, C. Ponce, J. Olazabal & R. Dávalos. 1999. Criopreservación de semen de alpacas. En: II Congreso Mundial sobre Camélidos. Cusco, Perú.
- Vaughan JL., D. Galloway & D. Hopkins. 2003. Artificial insemination in alpacas (*Lama pacos*). RIRDC project; no.AAA-1A, Rural Industries Research and Development Corporation: 90.
- Vaughan JL. 2001. Control of ovarian follicular growth in the alpaca (*Lama pacos*). Animal Sciences and Production Group Central Queensland University.
- Vazquez J. M., et al. 1997. Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analysing the sperm membrane. *Theriogenology*, Amsterdam, 47(4): 913-922.
- von Kubicek J. 1974. Semen collection in alpaca with a urethral fistula. *Zeitschrift Tierzuchtung und Zuchtungsbiologie* 90: 335-351.
- Watson P. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science* 60-61:481-492.
- Wheeler J., M. Kadwell, M. Fernández, H. F.Stanley, R. Baldi, R. Rosadio & M.W. Bruford. 2001. Genetic analysis reveals the wild ancestors of the llama and the alpaca. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 268 (1485): 2575–2584.
- World Health Organization.WHO Laboratory manual for the Examination and processing of human semen. Fifth edition.WHO Library Cataloguing in Publication Data. 2010. 286pp.
- Wuliji T., G.H. Davis, K.G. Dodds, P.R. Turner, R.N. Andrews & G.D. Bruce. 2000. Production performance, repeatability and heritability estimates for live weight, fleece weight and fiber characteristics of alpacas in New Zealand. *Small Ruminant Research* 37: 189-201.

11. ANEXOS

11.1 Análisis estadístico

11.1.1 Prueba de Normalidad

Los datos de los parámetros espermáticos mostraron una distribución normal en cada tratamiento.

Pruebas de normalidad							
	Tratamiento	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Movilidad	Pre	,211	16	,054	,831	16	,007
	Post Cn	,130	16	,200 [*]	,959	16	,653
	Post T1	,129	16	,200 [*]	,937	16	,317
	Post T2	,107	16	,200 [*]	,970	16	,834
	Post T3	,133	16	,200 [*]	,975	16	,908

*. Este es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de la significación de Lilliefors

Pruebas de normalidad							
	Tratamiento	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Vitalidad	Pre	,202	16	,081	,934	16	,284
	Post Cn	,136	16	,200 [*]	,927	16	,217
	Post T1	,106	16	,200 [*]	,952	16	,524
	Post T2	,102	16	,200 [*]	,961	16	,683
	Post T3	,168	16	,200 [*]	,954	16	,551

*. Este es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de la significación de Lilliefors

Pruebas de normalidad							
	Tratamiento	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Integridad de membrana plasmática	Pre	,095	16	,200 [*]	,951	16	,508
	Post Cn	,148	16	,200 [*]	,954	16	,554
	Post T1	,155	16	,200 [*]	,911	16	,119
	Post T2	,123	16	,200 [*]	,947	16	,449
	Post T3	,150	16	,200 [*]	,935	16	,295

*. Este es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de la significación de Lilliefors

Pruebas de normalidad

	Tratamiento	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Integridad de membrana acrosomal	Pre	,121	16	,200 [*]	,964	16	,733
	Post Cn	,132	16	,200 [*]	,935	16	,291
	Post T1	,111	16	,200 [*]	,963	16	,715
	Post T2	,200	16	,087	,861	16	,020
	Post T3	,179	16	,183	,938	16	,322

*. Este es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de la significación de Lilliefors

11.1.2 Evaluación de las muestras espermáticas pre congelación y post descongelación

Prueba t-Student para muestras relacionadas

Movilidad		Diferencias relacionadas					t	gl	Sig. (bilateral)
		Media	Desviación típ.	Error típ. de la media	95% Intervalo de confianza para la diferencia				
					Inferior	Superior			
Par 1	Pre - Post Cn	18,175	5,773	1,443	15,099	21,251	12,593	15	,000
Par 2	Pre - Post T1	15,423	6,194	1,549	12,123	18,724	9,960	15	,000
Par 3	Pre - Post T2	18,555	4,998	1,250	15,892	21,219	14,850	15	,000
Par 4	Pre - Post T3	23,215	4,889	1,222	20,610	25,821	18,992	15	,000

Prueba t-Student para muestras relacionadas

Vitalidad		Diferencias relacionadas					t	gl	Sig. (bilateral)
		Media	Desviación típ.	Error típ. de la media	95% Intervalo de confianza para la diferencia				
					Inferior	Superior			
Par 1	Pre - Post Cn	27,409	6,686	1,672	23,846	30,972	16,397	15	,000
Par 2	Pre - Post T1	23,875	6,592	1,648	20,363	27,388	14,488	15	,000
Par 3	Pre - Post T2	26,616	6,505	1,626	23,150	30,082	16,366	15	,000
Par 4	Pre - Post T3	28,467	6,597	1,649	24,952	31,982	17,262	15	,000

Pruebat-Student para muestras relacionadas

Integridad de membrana plasmática	Diferencias relacionadas					t	gl	Sig. (bilateral)
	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media	95% Intervalo de confianza para la diferencia				
				Inferior	Superior			
Par 1 Pre - Post Cn	24,281	7,108	1,777	20,493	28,068	13,664	15	,000
Par 2 Pre - Post T1	19,388	7,238	1,809	15,531	23,245	10,715	15	,000
Par 3 Pre - Post T2	22,980	6,645	1,661	19,439	26,521	13,833	15	,000
Par 4 Pre - Post T3	24,668	6,742	1,686	21,075	28,261	14,635	15	,000

Prueba t-Student para muestras relacionadas

Integridad de membrana acrosomal		Diferencias relacionadas					t	gl	Sig. (bilateral)
		Media	Desviación típ.	Error típ. de la media	95% Intervalo de confianza para la diferencia				
					Inferior	Superior			
Par 1	Pre - Post Cn	23,007	4,940	1,235	20,374	25,639	18,631	15	,000
Par 2	Pre - Post T1	17,849	5,478	1,370	14,929	20,768	13,032	15	,000
Par 3	Pre - Post T2	25,722	7,450	1,862	21,752	29,692	13,811	15	,000
Par 4	Pre - Post T3	32,505	5,336	1,334	29,661	35,348	24,366	15	,000

11.1.3 Evaluación de las muestras espermática post descongelación, según la concentración de L-cisteína empleado

Según las pruebas estadísticas de ANOVA y Tukey, se concluye que existen diferencias significativas entre los tratamientos.

11.1.3.1 Movilidad Post descongelación

ANOVA de un factor

Movilidad					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	501,404	3	167,135	34,913	,000
Intra-grupos	287,233	60	4,787		
Total	788,637	63			

Pruebas post hoc

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Movilidad

	(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
	Tratamiento	Tratamiento				Límite inferior	Límite superior
HSD de Tukey		Post T1	-2,7516 [*]	,7736	,004	-4,7958	-,7075
	Post Cn	Post T2	,3801	,7736	,961	-1,6640	2,4243
		Post T3	5,0400 [*]	,7736	,000	2,9959	7,0842
		Post Cn	2,7516 [*]	,7736	,004	,7075	4,7958
	Post T1	Post T2	3,1318 [*]	,7736	,001	1,0876	5,1759
		Post T3	7,7917 [*]	,7736	,000	5,7475	9,8358
		Post Cn	-,3801	,7736	,961	-2,4243	1,6640
	Post T2	Post T1	-3,1318 [*]	,7736	,001	-5,1759	-1,0876
		Post T3	4,6599 [*]	,7736	,000	2,6158	6,7041
		Post Cn	-5,0400 [*]	,7736	,000	-7,0842	-2,9959
	Post T3	Post T1	-7,7917 [*]	,7736	,000	-9,8358	-5,7475
		Post T2	-4,6599 [*]	,7736	,000	-6,7041	-2,6158

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

Subconjuntos homogéneos

Movilidad					
	Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
			1	2	3
HSD de Tukey ^a	Post T3	16	23,314694		
	Post T2	16		27,974606	
	Post Cn	16		28,354725	
	Post T1	16			31,106375
	Sig.		1,000	,961	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 16.000.

11.1.3.2 Vitalidad post descongelación

ANOVA de un factor

Vitalidad					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	185,065	3	61,688	8,750	,000
Intra-grupos	422,997	60	7,050		
Total	608,062	63			

Pruebas post hoc

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Vitalidad

	(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
HSD de Tukey	Post Cn	Post T1	-3,5337 [*]	,9387	,002	-6,0144	-1,0531
		Post T2	-,7927	,9387	,833	-3,2734	1,6880
		Post T3	1,0586	,9387	,674	-1,4220	3,5393
	Post T1	Post Cn	3,5337 [*]	,9387	,002	1,0531	6,0144
		Post T2	2,7410 [*]	,9387	,025	,2604	5,2217
		Post T3	4,5923 [*]	,9387	,000	2,1117	7,0730
	Post T2	Post Cn	-,7927	,9387	,833	-1,6880	3,2734
		Post T1	-2,7410 [*]	,9387	,025	-5,2217	-,2604
		Post T3	1,8513	,9387	,210	-,6293	4,3320
	Post T3	Post Cn	-1,0586	,9387	,674	-3,5393	1,4220
		Post T1	-4,5923 [*]	,9387	,000	-7,0730	-2,1117
		Post T2	-1,8513	,9387	,210	-4,3320	,6293

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

Subconjuntos homogéneos

Vitalidad				
	Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
			1	2
HSD de Tukey ^a	Post T3	16	26,314031	30,906369
	Post Cn	16	27,372650	
	Post T2	16	28,165350	
	Post T1	16		
	Sig.		,210	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 16.000.

11.1.3.3 Integridad de membrana plasmática post descongelación

ANOVA de un factor

Integridad de membrana plasmática

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	277,649	3	92,550	12,124	,000
Intra-grupos	458,019	60	7,634		
Total	735,668	63			

Pruebas post hoc

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Integridad de membrana plasmática

	(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
HSD de Tukey	Post Cn	Post T1	-4,8929 [*]	,9768	,000	-7,4742	-2,3116
		Post T2	-1,3005	,9768	,547	-3,8818	1,2809
		Post T3	,3870	,9768	,979	-2,1943	2,9683
		Post Cn	4,8929 [*]	,9768	,000	2,3116	7,4742
	Post T1	Post T2	3,5925 [*]	,9768	,003	1,0112	6,1738
		Post T3	5,2799 [*]	,9768	,000	2,6986	7,8612
		Post Cn	1,3005	,9768	,547	-1,2809	3,8818
		Post T2	-3,5925 [*]	,9768	,003	-6,1738	-1,0112
	Post T2	Post T1	-3,5925 [*]	,9768	,003	-6,1738	-1,0112
		Post T3	1,6874	,9768	,319	-,8939	4,2687
		Post Cn	-,3870	,9768	,979	-2,9683	2,1943
		Post T3	-5,2799 [*]	,9768	,000	-7,8612	-2,6986
	Post T3	Post T1	-5,2799 [*]	,9768	,000	-7,8612	-2,6986
		Post T2	-1,6874	,9768	,319	-4,2687	,8939

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

Subconjuntos homogéneos

Integridad de membrana plasmática

	Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
			1	2
HSD de Tukey ^a	Post T3	16	32,809250	38,089144
	Post Cn	16	33,196213	
	Post T2	16	34,496663	
	Post T1	16		
	Sig.		,319	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 16.000.

11.1.3.4 Integridad de membrana acrosomal post descongelación

ANOVA de un factor

Integridad de membrana acrosomal

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	1787,975	3	595,992	17,673	,000
Intra-grupos	2023,430	60	33,724		
Total	3811,405	63			

Pruebas post hoc

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Integridad de membrana acrosomal

	(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
HSD de Tukey	Post Cn	Post T1	-5,1579	2,0532	,068	-10,5834	,2677
		Post T2	2,7157	2,0532	,552	-2,7098	8,1412
		Post T3	9,4983*	2,0532	,000	4,0727	14,9238
		Post Cn	5,1579	2,0532	,068	-,2677	10,5834
	Post T1	Post T2	7,8735*	2,0532	,002	2,4480	13,2991
		Post T3	14,6561*	2,0532	,000	9,2306	20,0817
		Post Cn	-2,7157	2,0532	,552	-8,1412	2,7098
		Post T2	-7,8735*	2,0532	,002	-13,2991	-2,4480
	Post T2	Post T1	-7,8735*	2,0532	,002	-13,2991	-2,4480
		Post T3	6,7826*	2,0532	,009	1,3570	12,2081
		Post Cn	-9,4983*	2,0532	,000	-14,9238	-4,0727
		Post T3	-14,6561*	2,0532	,000	-20,0817	-9,2306
	Post T3	Post T1	-14,6561*	2,0532	,000	-20,0817	-9,2306
		Post T2	-6,7826*	2,0532	,009	-12,2081	-1,3570

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

Subconjuntos homogéneos

Integridad de membrana acrosomal

	Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
			1	2	3
HSD de Tukey ^a	Post T3	16	29,269388		
	Post T2	16		36,051963	
	Post Cn	16		38,767663	38,767663
	Post T1	16			43,925513
	Sig.		1,000	,552	,068

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 16.000.

11.2 Fotos



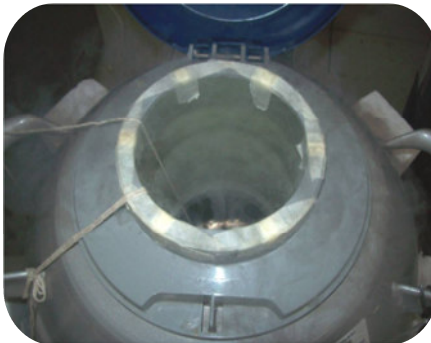
A. Sistema CRYOBATH dirigido por el software Cryogenesis Versión 4.0 (Cryologics)



B. Proceder a colocar las pajillas en el cryobath para iniciar el protocolo de criopreservación



C. Realizar la siembra (Seeding) para el sembrado de cristales de hielo.

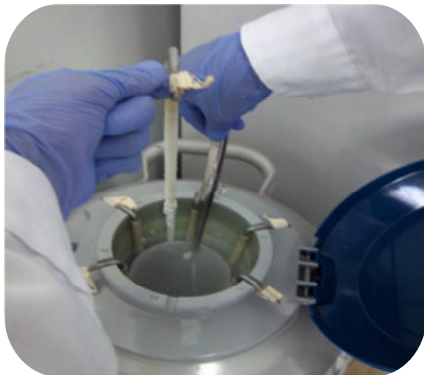


D. Sumergir las pajillas en nitrógeno líquido (-196°C)



E. Congelar las pajillas hasta su posterior uso

Figura N° 25: Fotografías de la criopreservación de espermatozoides de alpaca en la Universidad Nacional de Huancavelica



A. Descongelar a 50°C por 7 seg.



B. Cortar un extremo de la pajilla y recuperar la muestra en HAMF10 atemperado



C. Vaciar toda la muestra contenida en la pajilla



D. Incubar la muestra a 37°C



E. Realizar las evaluaciones de motilidad



F. Realizar evaluación de la integridad acrosomal con el objetivo de 100

Figura N° 26: Fotografías de la descongelación y posterior evaluación de las muestras en la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM